

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Frau Prof. Heidrun Potschka

**Evaluierung von Radiopharmaka zur
bildgebenden Darstellung der
Pharmakoresistenz in einem *Status epilepticus*-
Modell**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Christina Julia Michler
aus München

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferentin: Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	ÜBERSICHT.....	3
2.1	EPILEPSIE	3
2.1.1	Klassifizierung und Bedeutung.....	3
2.1.2	Diagnostik.....	7
2.1.3	Tiermodelle	9
2.2	PHARMAKORESISTENZ	13
2.2.1	Definition und Bedeutung.....	13
2.2.2	Mechanismen der Pharmakoresistenz.....	16
2.2.2.1	Multidrug-Transporter-Hypothese.....	17
2.2.2.2	Target-Hypothese	22
2.2.3	Inflammation und Mikroglia.....	26
2.3	POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE.....	33
2.3.1	Aufbau und Funktionsprinzipien	33
2.3.2	Radiopharmaka und deren klinische Anwendung	35
2.3.2.1	[¹⁸ F]Fluorodeoxyglucose.....	36
2.3.2.2	[¹¹ C]Flumazenil.....	37
2.3.2.3	[¹¹ C]PK11195	38
3	ZIELSETZUNG UND ARBEITSHYPOTHESEN.....	40
4	MATERIAL UND METHODEN	43
4.1	POST-STATUS EPILEPTICUS-MODELL.....	43
4.1.1	Versuchstiere	43
4.1.2	Elektrisches Status epilepticus-Modell.....	44
4.1.3	Anfallsparameter.....	47
4.1.4	Überwachung spontaner Anfälle in der Vehikelfase	48
4.1.5	Selektion der Responder und Nonresponder.....	50
4.1.6	Überprüfung der Phenobarbital-Plasmakonzentration	50
4.2	POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE (PET).....	52
4.2.1	PET-Scanner und Radiopharmaka	52
4.2.2	Ablauf der PET-Untersuchungen.....	53
4.2.3	Rekonstruktion und Analyse der PET-Daten	56
4.3	HISTOLOGIE.....	57
4.3.1	Histologische Gewebeaufbereitung	57
4.3.2	Histologische und immunhistochemische Färbemethoden.....	57
4.3.3	Auswertung und Statistik.....	60

4.4	VERSUCHSDSIGN	64
5	ERGEBNISSE	66
5.1	POST-STATUS EPILEPTICUS-MODELL.....	66
5.1.1	Erfassung spontaner Anfälle während der Vehikelfase	67
5.1.2	Selektion der Responder und Nonresponder.....	68
5.1.3	Überprüfung der Phenobarbital-Plasmakonzentration	69
5.2	PET-UNTERSUCHUNGEN	71
5.2.1	[¹¹ C]Flumazenil.....	72
5.2.2	[¹¹ C]PK11195.....	76
5.2.3	[¹⁸ F]Fluorodeoxyglucose	78
5.2.4	Korrelation zwischen Anreicherung der Tracer und Anfallsreduktion.....	80
5.3	HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE	81
5.3.1	P-Glycoprotein	81
5.3.2	Korrelation zwischen Pgp-Expression und Anfallsfrequenz.....	82
5.3.3	γ ₂ -Untereinheit des GABA _A -Rezeptors.....	83
5.3.4	Korrelation zwischen γ ₂ -Expression und Anfallsfrequenz.....	85
5.3.5	Nissl-Färbung	86
5.3.6	Korrelation zwischen Neurodegeneration und Anfallsfrequenz.....	88
6	DISKUSSION	89
6.1	UNTERSUCHUNGEN IM HINBLICK AUF DIE MULTIDRUG-TRANSPORTER-HYPOTHESE	91
6.2	UNTERSUCHUNGEN IM HINBLICK AUF DIE TARGET-HYPOTHESE	94
6.3	UNTERSUCHUNGEN IM HINBLICK AUF INFLAMMATIONSPROZESSE	99
6.4	INTERAKTIONEN DER VERSCHIEDENEN RESISTENZMECHANISMEN	102
6.5	SCHLUSSBETRACHTUNGEN.....	104
7	ZUSAMMENFASSUNG	105
8	SUMMARY	108
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	110
10	DANKSAGUNG	139
11	ANHANG	141
11.1	GERÄTE	141
11.2	LÖSUNGEN	143
11.3	SUBSTANZEN	145
11.4	PROTOKOLLE	147

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AE	Antiepileptikum
Aqua dest.	Aqua destillata
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLA	Basolaterale Amygdala
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	<i>Cornu ammonis</i> (Ammonshorn)
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
d.h.	das heißt
EEG	Elektroenzephalogramm
fMRI	<i>Functional magnetic resonance imaging</i>
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GD	<i>Gyrus dentatus</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Hz	Hertz
IBE	<i>International Bureau for Epilepsy</i>
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILAE	<i>International League against Epilepsy</i>
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
LOR	<i>Line of response</i> , Koinzidenzlinie
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
m	Meter
MBq	Megabequerel
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
μA	Mikroampere
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
MRI	<i>Magnet resonance imaging</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MRP	<i>Multidrug resistance protein</i>
NaCl	Natriumchlorid
Nmol	Nanomol
OD	Optische Dichte
OP	Operation
OSWLS	<i>Ordered subsets weighted least squares method</i>
PBR	Peripherer Benzodiazepinrezeptor (TSPO)
PC	<i>Personal Computer</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Pgp	P-Glycoprotein
PLEDS	Periodisch lateralisierte epileptische Entladung

RAID	<i>Redundant array of independent disks</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
s.c.	subkutan
SE	<i>Status epilepticus</i>
sec	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SPECT	<i>Single photon emission computed tomography</i> , Einzelphotonen-Emissions-Tomographie
SSSE	<i>Self sustained status epilepticus</i>
SUDEP	<i>Sudden unexpected death in epilepsy</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TLE	Temporallappenepilepsie
TNF	Tumornekrosefaktor
TSPO	<i>Translocator Protein</i> (PBR)
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i>
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Weltweit leiden etwa 70 Millionen Menschen an Epilepsie (NGUGI et al. 2010), einer der häufigsten neurologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (BROWNE u. HOLMES 2001). Bei den Haustieren Hund und Katze gehört die Epilepsie ebenfalls zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen (DEWEY 2006). Für die Pharmakotherapie steht eine Vielzahl von Antiepileptika zur Verfügung, die bei der Mehrheit der Patienten gute Dienste im Sinne einer Anfallssuppression leistet. Dennoch wird bei über 30% der Veterinär- und Humanpatienten keine befriedigende Reduktion der Anfälle erreicht (HITIRIS et al. 2007; WEISSL et al. 2012).

Die aus dieser Pharmakoresistenz resultierenden Konsequenzen können sehr schwerwiegend sein. Zusätzlich zu den epileptischen Anfällen selbst und den damit verbundenen Gefahren können erhöhte Mortalitätsraten sowie unerwünschte Nebenwirkungen der Therapie die betroffenen Tiere und Menschen erheblich belasten. Therapieresistente epileptische Haustiere werden nicht selten euthanasiert, da weder diagnostische noch alternative therapeutische Strategien wie z.B. die bildgebende Darstellung mittels Positronen-Emissions-Tomographie und die chirurgische Entfernung des epileptischen Fokus in der Veterinärmedizin etabliert sind.

Beim Humanpatienten treten zudem oftmals epilepsie-assoziierte psychiatrische Komorbiditäten auf. Die damit verbundene Einschränkung der Lebensqualität kann sich auf die berufliche Tätigkeit, die Freizeitgestaltung und die soziale Eingliederung in die Gesellschaft auswirken.

Die Mechanismen, die diesen mangelhaften Therapieerfolgen zugrunde liegen, sind längst nicht gänzlich verstanden. Jedoch wird davon ausgegangen, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt, bei dem Veränderungen der Zielstrukturen von Wirkstoffen (*Target*-Hypothese) (REMY u. BECK 2006) sowie *Multidrug*-Transporter an der Blut-Hirn-Schranke (*Mutidrug*-Transporter-Hypothese) (POTSCHKA 2010b) beteiligt sind. Auch Inflamationsprozessen wird immer mehr Bedeutung in der Entstehung und Progression, sowie in der

Beeinflussung des Schweregrades von Epilepsien zugemessen (VEZZANI et al. 2011b). Die Zukunft der Epilepsietherapie muss in einer Patientenbetreuung liegen, bei der frühzeitig und individuell für jeden Patienten die Hauptursache der Pharmakoresistenz ermittelt und eine entsprechende Therapiestrategie gewählt werden kann. Therapieversuche mit weiteren Wirkstoffen, wie sie derzeit bei Nichtansprechen auf eine initiale Therapie durchgeführt werden, sind häufig erfolglos und führen zu Nebenwirkungen, Enttäuschung und Entmutigung. Dies könnte den Patienten durch frühzeitige Feststellung der Therapieresistenz und Entscheidung zu alternativen Therapiestrategien erspart bleiben.

Diese Arbeit soll zur Optimierung der nicht-invasiven bildgebenden Methode der Positronen-Emissions-Tomographie beitragen, um pharmakoresistente Epilepsiepatienten identifizieren zu können. Dies kann zur Verbesserung der Diagnostik für eine bessere Nutzen-Risiko-Abwägung verschiedener therapeutischer Möglichkeiten genutzt werden. Des Weiteren kann die Überwachung des Therapieerfolges sowie die Einschätzung der Prognose durch eine solche Methode positiv beeinflusst werden. Dadurch soll ein optimiertes und individualisiertes Patientenmanagement ermöglicht werden. Die genauere Kenntnis von Mechanismen der Pharmakoresistenz ist zudem eine grundlegende Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

2 Übersicht

2.1 Epilepsie

2.1.1 Klassifizierung und Bedeutung

Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), von der weltweit etwa 70 Millionen Menschen betroffen sind (NGUGI et al. 2010). Die Internationale Liga gegen Epilepsie (*International League against Epilepsy*, ILAE) und das *International Bureau for Epilepsy* (IBE) definieren Epilepsien als eine Störung des Gehirns, die durch die dauerhafte Prädisposition zur Entwicklung epileptischer Anfälle, sowie durch die neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen dieses Zustandes charakterisiert ist (FISHER et al. 2005). Dabei handelt es sich nicht um ein einheitliches Krankheitsbild, sondern vielmehr um eine Vielfalt von Syndromen und Krankheitskomplexen, denen unterschiedlichste Ursachen und damit einhergehende zerebrale Dysfunktionen zugrunde liegen (FROSCHER u. NEHER 1994; FISHER et al. 2005). Ein epileptischer Anfall ist das wiederholte, spontane, nicht vorhersehbare und vorübergehende Auftreten von Anzeichen und/oder Symptomen aufgrund abnormer exzessiver und synchroner neuronaler Aktivität im Gehirn (FISHER et al. 2005; BERG et al. 2010). So erklärt sich auch der Begriff der Epilepsie, welcher sich aus dem Altgriechischen herleitet und soviel bedeutet wie „der Übergriff“ oder „der Anfall“.

Als Grundlage für die erfolgreiche Therapie ist die Einteilung epileptischer Syndrome durch die Kommission für Klassifikation und Terminologie der ILAE von entscheidender Bedeutung (BROWNE u. HOLMES 2001). Berücksichtigt werden hierbei Muster und Ursache der Anfälle, Erstmanifestationsalter, auslösende Faktoren und elektroenzephalographische Befunde (ILAE 1989; SCHMIDT 1992; BERG et al. 2010). Es wird unterschieden zwischen fokalen Anfällen, die ihren Ursprung unilateral in einem umschriebenen Areal des Cortex nehmen, und generalisierten Anfällen, wobei beide Großhirnhemisphären ursächlich betroffen sind (KWAN u. BRODIE 2006). Fokale Anfälle können einfach (ohne

Bewusstseinseinschränkung) oder komplex (mit Bewusstseinseinschränkung) auftreten und sekundär generalisieren, d.h. sich zu einem bilateralen, konvulsiven Anfallsgeschehen entwickeln (FISHER et al. 2005). Aufgrund unterschiedlicher klinischer Symptomatik erfolgt eine weitere Unterteilung sowohl primär als auch sekundär generalisierter Anfälle in tonische (Streckkrämpfe), klonische (Ruderkrämpfe), tonisch-klonische, myoklonische Krämpfe (Erschlaffung) und Absencen (Bewusstseinsminderung mit nachfolgender Amnesie). Zieht sich ein Anfall oder eine Serie von Anfällen, bei der das Bewusstsein nicht wiedererlangt wird, über die Dauer von 30 Minuten hin, wird von einem *Status epilepticus* (SE) gesprochen (DUPONT u. CRESPEL 2009). Eine weitere Möglichkeit der Einteilung von Epilepsien stützt sich auf die zugrunde liegende Ätiologie. Die ILAE empfiehlt die bisher bestehende Terminologie symptomatisch, idiopathisch und kryptogen (KWAN u. BRODIE 2006) durch die Begriffe strukturell-metabolisch, genetisch und Epilepsie unbekannter Ursache zu ersetzen (BERG et al. 2010). Als strukturell-metabolisch (früher symptomatisch) werden Epilepsien bezeichnet, deren Ursache ein bekannter oder vermuteter initialer Insult darstellt (STEFAN et al. 2006). Häufig liegt der Ursprung einer Epilepsie in organischen Veränderungen des Großhirns (z.B. durch Trauma, Infektion, Neoplasie oder vaskuläre Schädigung) begründet, allerdings können auch extrazerebrale metabolische Störungen, wie z.B. Intoxikationen, epileptische Anfälle induzieren (HAUSER u. BEGHI 2008). Bei genetischen Epilepsien (früher idiopathisch) ist die Ursache in einer Veränderung der genetischen Information zu suchen. In diesem Fall geht keine bekannte Grunderkrankung voraus (BERG et al. 2010). Als Epilepsien unbekannter Genese werden alle Epilepsien zusammengefasst, deren Ursache nicht detailliert bekannt ist, diese können jedoch sowohl genetischer, als auch struktureller oder metabolischer Natur sein (BERG et al. 2010).

Temporallappenepilepsie (TLE)

Abhängig von der anatomischen Lokalisation des epileptischen Fokus im Gehirn werden bei fokalen Epilepsien die Temporal-, Frontal-, Parietal- und Okzipitallappenepilepsie unterschieden (DREIFUSS 1994). Die meisten aller komplex-fokalen Anfälle nehmen ihren Ursprung im Temporallappen, vorrangig im Hippocampus, in der Amygdala und im parahippocampalen Cortex (WOLF et al. 1993; CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Somit ist die häufigste Epilepsieform des Menschen die Temporallappenepilepsie (HAUSER et al. 1993; ENGEL 2001). Sie ist charakterisiert durch einfache oder komplexe fokale Anfälle, welche sekundär generalisieren können (CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Ergänzt wird das Krankheitsbild durch psychiatrische Leiden wie Einschränkungen im Lern- und Erinnerungsvermögen, Depressionen, Verhaltensänderungen und Angststörungen (MARCANGELO u. OVSEW 2007). In den meisten Fällen entwickelt sich die TLE als Folge einer strukturellen Veränderung des Gehirns, welche durch einen sogenannten initialen Insult ausgelöst wird. Dieser kann in Form von Schädel-Hirn-Traumata, vaskulären Schädigungen wie Schlaganfällen, Neoplasien oder Infektionen des Gehirns auftreten. Des Weiteren kommen Fieberkrämpfe im frühen Kindesalter als Ursache in Betracht (PITKANEN et al. 2007; BERTRAM 2009). Es folgt eine individuell sehr unterschiedliche, oftmals jahrelange Latenzzeit, in der es vermutlich zu aktiven Veränderungen im Gehirn kommt, welche zu einem Zustand erhöhter neuronaler Synchronisation und Exzitabilität führen (BAUMGARTNER 2001), bis schließlich die chronische epileptische Phase beginnt, die durch wiederholte, spontan auftretende Anfälle gekennzeichnet ist (FRENCH et al. 1993; ENGLANDER et al. 2003). Bei zahlreichen TLE-Patienten ist eine hippocampale Sklerose als charakteristische Schädigung des Hippocampus nachzuweisen. Insbesondere in Regionen des Ammonshorns (*Cornu ammonis*, CA) des Hippocampus sowie im Hilus des *Gyrus dentatus* kann es zu erheblichen Neuronenverlusten von typischerweise über 50% kommen (ENGEL 1996; FISHER et al. 1998). Außerdem können Cerebellum, Thalamus, Amygdala sowie entorhinale, perirhinale und parahippocampale Gebiete von massiver Neurodegeneration betroffen sein (PITKANEN et al. 1998; YILMAZER-

HANKE et al. 2000; JUTILA et al. 2002). Obwohl 90% der pharmakoresistenten TLE-Patienten eine hippocampale Sklerose aufweisen (MATHERN et al. 1995), ist diese nicht zwingend Voraussetzung für die Manifestation einer TLE (BLUMCKE et al. 1999; BRANDT et al. 2004). Aus diesem Grund bleibt bisher die Frage ungeklärt, ob es sich bei der Temporalsklerose um eine Ursache oder eine Konsequenz der TLE handelt (FISHER et al. 1998; JEFFERYS 1999; MASUKAWA et al. 1999).

2.1.2 Diagnostik

Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Epilepsiebehandlung ist die möglichst genaue individuelle Charakterisierung der klinischen Anfallssymptomatik. Für die Wahl der optimalen therapeutischen Strategie ist deshalb eine sorgfältige diagnostische Aufarbeitung erforderlich. Anamnestisch sollte sowohl eine subjektive Schilderung des Patienten als auch eine objektive Beschreibung der Geschehnisse durch einen Beobachter erhoben werden. Außerdem sollten Betroffene mit Hilfe von Angehörigen einen Anfallskalender führen, um genaue Aussagen über die Anfallsfrequenz treffen zu können. Durch elektrophysiologische Untersuchungen mittels Elektroenzephalogramm (EEG) können epilepsietypische Veränderungen wie *Spikes*, *Sharp Waves* oder periodisch lateralisierte epileptiforme Entladungen (PLEDS) aufgespürt sowie lokalisiert werden (POHLMANN-EDEN et al. 1996) und so zur Differenzierung von fokalen und generalisierten Epilepsien beitragen. Letztere Unterscheidung ist besonders maßgeblich für die Wahl einer geeigneten Therapiestrategie. Da das EEG die anamnestische Verdachtsdiagnose bestätigen soll, wird hier von elektroklinischer Diagnose gesprochen (BAUMGARTNER 2001). Durch EEG-Ableitungen im Schlaf lässt sich die Sensitivität dieser Untersuchungsmethode steigern. Eine weitere Steigerung kann durch 24stündigen Schlafentzug erreicht werden (DEGEN u. DEGEN 1991). Bei im Routine-EEG nicht eindeutig zu klassifizierenden Fällen kann die Aufzeichnung eines mobilen Langzeit-EEGs indiziert sein (BRIDGERS u. EBERSOLE 1985; BRIDGERS et al. 1989), z.B. um Differentialdiagnosen wie kardiale Arrhythmien oder Synkopen auszuschließen. Allerdings sollte bedacht werden, dass das Vorliegen einer Epilepsie weder durch ein unauffälliges EEG ausgeschlossen, noch durch ein pathologisches EEG bewiesen werden kann (BAUMGARTNER 2001).

Eine wertvolle Ergänzung der elektroklinischen Diagnose bieten strukturelle und funktionelle bildgebende Verfahren, mit deren Hilfe zugrunde liegende pathologische Veränderungen wie z.B. Tumoren, kortikale Malformationen, traumatische Läsionen oder Infarkte identifiziert werden können (KAUFFMANN et al. 2011). Außerdem ermöglichen sie in vielen Fällen eine genauere Zuordnung

der ätiologischen Diagnose sowie die Klassifikation des klinischen Syndroms, wodurch auch die Prognose besser eingeschätzt werden kann (BAUMGARTNER 2001; PANAYIOTOPOULOS 2005). Die Methode der Wahl ist aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität für die Darstellung struktureller Abnormalitäten die Magnetresonanztomographie (MRT) (ILAE 2000). So können z.B. die Hippocampalsklerose oder kortikale Dysgenesien ebenso wie vaskuläre Malformationen und Tumoren als Anfallsursache mithilfe der MRT identifiziert und lokalisiert werden (PANAYIOTOPOULOS 2005). Da die Computertomographie (CT) in dieser Hinsicht der MRT unterlegen ist, wird sie in der Akutdiagnostik nur im Zusammenhang mit Kopfverletzungen, intrakraniellen Blutungen oder Enzephalitiden angewendet, wenn keine MRT zur Verfügung steht oder diese aus technischen Gründen, wie z.B. einem implantierten Herzschrittmacher, kontraindiziert ist (PRICE 1999; ILAE 2000; PANAYIOTOPOULOS 2005). Bei den funktionellen bildgebenden Verfahren ist besonders die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zu nennen, welche bei der Darstellung von Stoffwechselvorgängen eine wichtige Rolle spielt (siehe Kap. 2.3.1). Weitere bildgebende Verfahren auf die hier nicht näher eingegangen wird, da sie bisher keinen Eingang in die Routinepraxis gefunden haben, sollen zum Zweck der Vollständigkeit erwähnt werden: Die funktionelle Magnetresonanztomographie (*functional magnetic resonance imaging, fMRI*) kann in Kombination mit dem EEG hilfreich sein, und zum Verständnis der pathophysiologischen Basis epileptischer Anfallsaktivität beitragen (ILAE 2000). Die Magnetresonanzspektroskopie (MRS) und die Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (*single photon emission computed tomographie, SPECT*) können in der prächirurgischen Epilepsiediagnostik angewendet werden, um die Lokalisierung des epileptischen Fokus zu erleichtern (ILAE 2000; BAUMGARTNER 2001; PANAYIOTOPOULOS 2005).

2.1.3 Tiermodelle

Die Kenntnis epilepsie-assoziierten Basismechanismen und Phänomene ist eine essentielle Grundlage für die Entwicklung neuer diagnostischer, therapeutischer und präventiver Ansätze für Epilepsien (PITKANEN et al. 2005). Tierversuchsmodelle für Epilepsien tragen noch immer dazu bei, dass das Wissen über die Mechanismen der Entstehung und Ausbreitung epileptischer Anfälle im Gehirn, sowie über die zugrundeliegenden histopathologischen Veränderungen stetig wächst. Geeignete Tiermodelle sind daher für die Entwicklung neuer diagnostischer, therapeutischer und präventiver Strategien unentbehrlich. Um die klinische Realität von Epilepsiepatienten bestmöglich widerzuspiegeln, werden folgende Ansprüche an ein ideales Tiermodell für die Epilepsie gestellt:

- 1) es sollte zum Auftreten spontaner Anfälle kommen, damit die Symptome im Modell weitestgehend den klinischen Anfallstypen der Humanpatienten entsprechen;
- 2) während eines epileptischen Anfalls auftretende EEG-Veränderungen sollten den beim Humanpatienten auftretenden EEG-Veränderungen ähneln;
- 3) den Symptomen im Modell und der zu erforschenden Krankheit sollte der gleiche Pathomechanismus zugrunde liegen;
- 4) die klinische Wirksamkeit sollte durch das Modell prognostizierbar sein.
- 5) eine hohe Anfallsfrequenz ermöglicht eine optimierte Einschätzung bzw. Bewertung der Effizienz von Arzneimitteln.

Diese Anforderungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass Erkenntnisse, die in Tiermodellen gewonnen wurden, später auf den Menschen übertragbar sind. Grundsätzlich kann zwischen zwei Modelltypen unterschieden werden. Bei den akuten Modellen, den sogenannten Anfallsmodellen, muss jeder epileptische Anfall induziert werden. Hierbei ist sowohl die chemische als auch die elektrische Induktion möglich. Sie eignen sich besonders zur Untersuchung der antikonvulsiven Wirkung neuer Wirkstoffe. Jedoch spiegeln sie nicht die Komplexität der Veränderungen im epileptischen Gehirn wider, wodurch die Aussagekraft reduziert wird. Im Gegensatz dazu kommt es bei den chronischen Modellen, den sogenannten Epilepsiemodellen, zum wiederholten Auftreten spontaner epileptischer Anfälle. Diese entwickeln sich als Folge eines initialen Insultes durch den die Epileptogenese, d.h. die

Entwicklung eines prokonvulsiven neuronalen Netzwerkes, induziert wird.

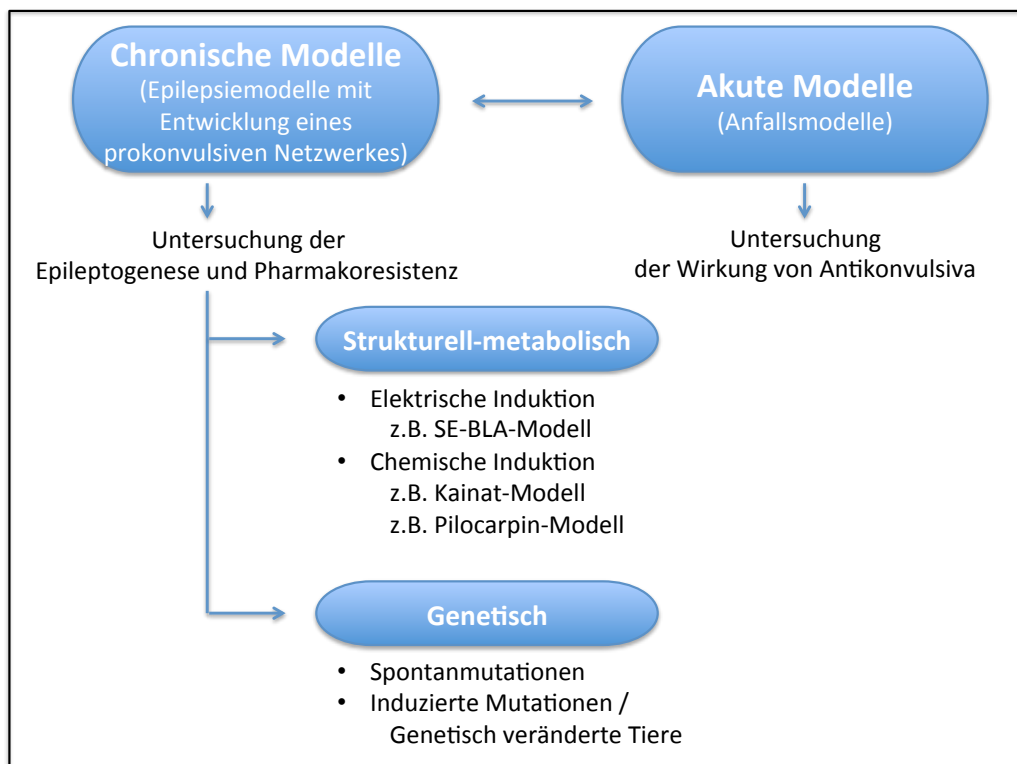


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Tiermodelle für die Epilepsie-Forschung. Grundsätzlich eignen sich chronische Modelle besonders zur Untersuchung der Epileptogenese und der Pharmakoresistenz, da es hierbei nach einer Latenzzeit zum Auftreten spontaner epileptischer Anfälle kommt. Akute Anfallsmodelle werden insbesondere angewendet, um die pharmakologische Wirkung antikonvulsiver Substanzen zu untersuchen. SE = *Status epilepticus*, BLA = Basolaterale Amygdala

Zur Untersuchung der Mechanismen, die zur Entstehung einer Epilepsie führen, können chemische Modelle wie z.B. das Kainsäure-Modell (BEN-ARI et al. 1981) oder das Pilocarpin-Modell (HONCHAR et al. 1983), elektrische Modelle wie z.B. das *Kindling*-Modell (GODDARD et al. 1969) oder das SE-basolaterale Amygdala (BLA)-Modell (BRANDT et al. 2003) angewendet werden. Des Weiteren können genetisch veränderte Tiere (LÖSCHER 1997) eingesetzt werden.

Da sowohl beim Veterinär-, als auch beim Humanpatienten häufig ein initialer Insult z.B. in Form eines SE zur Epilepsieentstehung führt, eignen sich chronische

Modelle sehr gut, um die klinische Situation von Epilepsiepatienten zu imitieren (LÖSCHER 2002). Aus diesem Grund sind sie als Modell für diagnostische Untersuchungen im Rahmen der Pharmakoresistenz gut geeignet. Zur Untersuchung der Pharmakoresistenz wird differenziert zwischen Modellen mit geringem Ansprechen auf verschiedenen AE und Modellen, in denen pharmakoresistente Tiere basierend auf interindividuellen Unterschieden selektiert werden (POTSCHKA 2012). Die Selektion von *Nonrespondern*, d.h. von therapieresistenten Tieren wurde sowohl im Amygdala-Kindling-Modell als auch im *Post-Status epilepticus*-Modell beschrieben (POTSCHKA 2012). Jedoch wird die routinemäßige Anwendung solcher Modelle dadurch limitiert, dass das Selektionsverfahren sehr mühselig und zeitaufwändig ist (POTSCHKA 2012). Dieses Dissertationsvorhaben soll u.a. dazu beitragen, Biomarker zu identifizieren, welche den Selektionsprozess der *Nonresponder* vereinfachen. Die wochenlange Phase, in der Anfälle überwacht werden, könnte so durch die bildgebende Darstellung, beispielsweise mithilfe der Positronen-Emissions-Tomographie, ersetzt werden.

Auf das elektrische SE-BLA-Modell, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

SE-BLA-Modell

Beim SE-BLA-Modell wird ein initialer Insult durch eine elektrische Dauerstimulation über eine in die Basolaterale Amygdala (BLA) implantierte Tiefenstimulationselektrode induziert. Als Reaktion auf die 25minütige elektrische Stimulation mit einer Stromstärke von 700µA entwickeln die Tiere einen SE, der trotz Beendigung der Stimulation weiter anhält, sich also selbst erhält (*self sustained status epilepticus*, SSSE) (BRANDT et al. 2003). Beeinflusst durch die Lokalisation der Elektrode, das Geschlecht der Tiere sowie den Rattenstamm können verschiedene Ausprägungen des SSSE unterschieden werden: Die Tiere zeigen entweder fokale Anfälle, generalisierte Anfälle oder fokales Anfallsgeschehen unterbrochen durch einzelne generalisierte Anfälle (HANDFORTH u. ACKERMANN 1988). Am häufigsten zeigten bei BRANDT et al.

(2003) weibliche *Sprague Dawley* Ratten einen rein generalisierten SSSE. Dieser SE-Typ bewirkt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle nach Ablauf einer Latenzzeit. Um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle (welche bei fokalen SSSE nur bei 33%, bei generalisierten SSSE jedoch bei 90% liegt) zu erhöhen, sollte der SSSE erst nach einer mindestens vier Stunden andauernden Krampfaktivität mit Diazepam unterbrochen werden (BRANDT et al. 2003). Dieses Rattenmodell für die Temporallappenepilepsie wurde entwickelt aus dem erstmalig durch GODDARD et al. (1969) beschriebenen Kindling-Modell und von MCINTYRE et al. (1982) bis zur Ausbildung eines fokalen SSSE weiterentwickelt. HANDFORTH und ACKERMANN (1988) nahmen erstmals eine Einteilung des SSSE in verschiedene Typen vor. Bei einem Post-SE Modell von NISSINEN et al. (2000) wurden nach einer Latenzzeit von einigen Wochen spontan auftretende Anfälle dokumentiert. BRANDT et al. (2003) entwickelten dieses zu einem Post-SE Modell weiter, welches sich gut eignet, um die klinische Situation von TLE-Patienten zu reflektieren.

2.2 Pharmakoresistenz

2.2.1 Definition und Bedeutung

Da eine Heilung von Epilepsien bisher nicht möglich ist (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002b) besteht das Haupttherapieziel in der Unterdrückung der klinischen Symptome durch eine chronische Behandlung mit antikonvulsiven Medikamenten (Antiepileptika, AE). Neben der Pharmakotherapie können beim Humanpatienten epilepsiechirurgische Eingriffe in Erwägung gezogen werden. Beim Veterinärpatienten sind diese Methoden jedoch noch nicht routinemäßig etabliert. Obwohl inzwischen eine Vielzahl von AE mit unterschiedlichen Wirkmechanismen auf dem Markt verfügbar sind, kann bei ca. 30% der Epilepsiepatienten kein zufriedenstellender Therapieerfolg erzielt werden (HITIRIS et al. 2007; WHO 2009). Besonders Patienten, die an einer TLE mit hippocampaler Sklerose leiden, erweisen sich sehr häufig als therapieresistent (PIERZCHALA 2010). Auch bei bis zu 30% der an Epilepsie erkrankten Hunden entwickelt sich eine Pharmakoresistenz (WEISSL et al. 2012).

Um die Patientenversorgung zu verbessern und die klinische Forschung zu erleichtern, wurde von der ILAE unlängst eine einheitliche Definition für pharmakoresistente Epilepsien vorgeschlagen. Demnach spricht man von Pharmakoresistenz, wenn trotz der adäquaten Auswahl und Anwendung von zwei oder mehr gut tolerierten AE in Mono- oder Kombinationstherapie keine anhaltende Anfallsfreiheit erreicht wird (KWAN et al. 2010). Für die Beurteilung ob die Behandlung adäquat durchgeführt wurde ist es besonders wichtig, individuell auf den Patienten einzugehen und dabei verschiedene Parameter wie die Medikamentenwahl, Dosierung, Tolerabilität, Alter des Patienten, Leber- und Nierenfunktion, sowie ggf. Wechselwirkungen mit anderen Therapeutika zu berücksichtigen (KWAN et al. 2010).

Bedeutung für Betroffene

Für Betroffene bringt die Epilepsieerkrankung häufig erhebliche Einschränkungen im Hinblick auf die Lebensqualität mit sich. Beim Veterinärpatienten sind diese insbesondere auf Nebenwirkungen der AE wie z.B. Lethargie, Ataxie, Ruhelosigkeit, Juckreiz, Durchfall und Erbrechen zurückzuführen (CHANG et al. 2006). Unkontrollierbare Anfälle oder das Auftreten eines SE können die Lebenserwartung verkürzen und führen in einigen Fällen sogar zur Euthanasie (ZIMMERMANN et al. 2009).

Beim Humanpatienten spielen hierbei die unkontrollierbaren und unvorhersehbaren epileptischen Anfälle, welche zu Unfällen verschiedenster Art führen können, eine entscheidende Rolle. Unter anderem treten durch Stürze offene Wunden, Frakturen, Luxationen, Verbrennungen, Gehirnerschütterungen und Schädel-Hirn-Traumen auf (FICKER 2000). Solche Unfälle können zudem besonders im Zusammenhang mit dem Straßenverkehr oder mit öffentlichen Verkehrsmitteln tödlich enden. Stürze aus großer Höhe, Verbrennen, Ertrinken oder Vergiftungen stellen ebenfalls keine Seltenheit dar (BAUMGARTNER 2001). Die Mortalitätsrate bei Epilepsiepatienten ist im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um das zwei- bis dreifache erhöht (AURLIEN et al. 2012). Ursache hierfür sind nicht nur Gefahren, die sich aus dem Alltag ergeben, sondern insbesondere der Epilepsie zugrunde liegende Grunderkrankungen, wie beispielsweise Hirntumoren oder zerebrovaskuläre Erkrankungen (NILSSON et al. 1997; AURLIEN et al. 2012). Auch der sogenannte plötzliche unerwartete Tod von Epilepsiepatienten (*sudden unexpected death in epilepsy*, SUDEP) spielt eine große Rolle (SURGES u. SANDER 2012). Trauma, Ertrinken und SE sind differentialdiagnostisch als Todesursache auszuschließen (NASHEF 1997). Es gibt Hinweise, dass kardiale Arrhythmien, postiktale Kardiomyopathien und anfallsassoziierte Atemnot potentielle Ursachen des SUDEP sein können (SURGES u. SANDER 2012). Häufig tritt der SUDEP während oder unmittelbar nach einem epileptischen Anfall auf. Das Risiko einen SUDEP zu erleiden, ist bei Patienten, die an therapieresistenten Epilepsien mit hoher Anfallsfrequenz leiden, erhöht (FICKER 2000).

Des Weiteren stellt der Suizid eine häufige Todesursache bei Epilepsiepatienten dar (SCAMBLER 1993). Etwa 10% der Todesfälle bei Epilepsien sind auf Suizid zurückzuführen (KWON et al. 2011). Psychosoziale Aspekte spielen in diesem Zusammenhang eine große Rolle. Viele Epilepsiepatienten leiden an der belastenden Diagnose sowie dem ungewissen Verlauf der Erkrankung (JACOBY 1992). Zudem fühlen sie sich durch ihr Anderssein von der Gesellschaft ausgegrenzt und diskriminiert, weshalb sie häufig soziale Kontakte meiden (SCAMBLER 2011). Hinzu kommen epilepsieassoziierte psychiatrische Komorbiditäten wie Angst- und Panikstörungen, Persönlichkeitsstörungen, Psychosen und Depressionen (PAULI u. STEFAN 2009a). Kognitive Defizite können ebenfalls als Begleiterscheinung von Epilepsien auftreten. Unter dem Begriff Kognition versteht man dabei die höhere geistige Funktion. Informationsverarbeitungsprozesse im Gehirn, die zum komplexen adaptiven Verhalten eines Organismus führen, beinhalten u. a. Aufmerksamkeit und Wahrnehmung, Gedächtnis- und Denksysteme, Konzeptbildung, soziale Intelligenz, sowie Abstraktions- und Entscheidungsvermögen (STEFAN u. PAULI 2008). Häufig erfordert die Epilepsieerkrankung die Aufgabe der beruflichen Tätigkeit sowie eine erhebliche Einschränkung der privaten Freizeitgestaltung. Auch der Verlust der Unabhängigkeit sowie die Überprotektion durch Angehörige beeinträchtigen Selbständigkeit und Selbsteffizienz der Betroffenen (PAULI u. STEFAN 2009b). Auch die wirtschaftliche Belastung für die Gesellschaft durch Investitionen in das Gesundheitswesen und die Arbeitslosigkeit der Epilepsiepatienten ist nicht unerheblich (KWAN 2011).

2.2.2 Mechanismen der Pharmakoresistenz

Da davon ausgegangen wird, dass es sich bei der Pharmakoresistenz von Epilepsien um ein komplexes und multifaktorielles Geschehen handelt, wurden verschiedene Hypothesen formuliert, um den mangelhaften Therapieerfolg zu erklären (POTSCHKA 2010b). Dabei kommt v.a. der *Intrinsic-severity*-Hypothese, der *Target*-Hypothese und der *Multidrug*-Transporter-Hypothese große Bedeutung zu. Unter der *Intrinsic-severity*-Hypothese versteht man die Annahme, dass der durch pathophysiologische sowie neurobiologische Faktoren bedingte Schweregrad der Erkrankung in deren Verlauf zunimmt und deshalb in einer Pharmakoresistenz resultiert (ROGAWSKI u. JOHNSON 2008). Die *Target*-Hypothese basiert auf der Vermutung, dass Veränderungen der zellulären Zielstrukturen von AE, sogenannter *Targets*, zu eingeschränkter Wirksamkeit dieser AE führen (REMY u. BECK 2006). Eine weitere Hypothese zur Erklärung der Resistenzmechanismen stellt die *Multidrug*-Transporter-Hypothese dar, wobei angenommen wird, dass es aufgrund der Überexpression von Effluxtransportern an der BHS zu einer nicht ausreichenden Konzentration der AE an den therapeutischen Zielstrukturen kommt (POTSCHKA 2010b).

Im Folgenden soll nun auf die beiden zuletzt genannten Hypothesen näher eingegangen werden. Die Aufklärung und das genauere Verständnis der Mechanismen, die zu Pharmakoresistenz führen, sind entscheidende Schritte für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Die frühzeitige Diagnose der Pharmakoresistenz bildet eine wichtige Grundlage für ein optimales und individuelles Patientenmanagement.

2.2.2.1 *Multidrug-Transporter-Hypothese*

Grundsätzlich müssen AE zunächst die Blut-Hirn-Schranke (BHS) oder die Blut-Liquor-Schranke überwinden, um den Ort ihrer Wirkung, das Gehirn, zu erreichen. Die Endothelzellen der Gehirnkapillaren sind durch dichte Zell-Zell-Kontakte, sogenannte *tight-junctions* eng miteinander verbunden und weisen im Gegensatz zu peripheren Kapillaren keine Fenestrierung auf (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b). Sie werden ebenso wie an der BHS beteiligte Perizyten von einer Basalmembran umgeben. Bis zu 90% der endothelialen Oberfläche ist von astrozytären Endfüßchen bedeckt, welche die Funktion der BHS zusätzlich unterstützen (ABBOTT 2002). Durch diesen charakteristischen Aufbau und den vorherrschenden Mangel an pinozytotischen Transportvesikeln besitzt die BHS eine physiologische Barrierefunktion, die das Gewebe vor dem Eindringen unerwünschter Substanzen schützt (HULS et al. 2009). Ob eine Substanz die BHS penetrieren kann wird einerseits durch ihre spezifischen Eigenschaften wie Lipidlöslichkeit, Molekulargewicht, Plasmaprotein- und Wasserstoffbindung bestimmt. Jedoch kommt den vorhandenen Transportmechanismen ebenfalls eine große Bedeutung zu (PARDRIDGE 2003). Wie bei einer Phospholipidmembran können große, hydrophobe, polare und proteingebundene Substanzen die BHS nicht passieren. Dagegen überwinden nicht-geladene, unpolare, kleine oder lipophile Wirkstoffe die BHS durch passive Diffusion oder werden mithilfe spezifischer *Carrier*-Systeme transportiert (SPECTOR 2000). Je höher die Lipidlöslichkeit einer Substanz ist, umso effektiver penetriert diese die BHS (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c). Allerdings zeigen viele Substanzen, unter anderem einige AE eine deutlich geringere Gehirngängigkeit als es ihre Lipidlöslichkeit zunächst vermuten lässt (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c). Ursächlich hierfür sind sogenannte *Multidrug-Transporter*, welche bestimmte Substanzen sehr effektiv aus dem ZNS ausschleusen können (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c). Solche Arzneimitteltransporter werden nicht nur an der BHS des ZNS exprimiert, sondern von allen Zellen des Körpers (SCHINKEL u. JONKER 2003). Man geht davon aus, dass zwischen 500 und 1200 Gene des Menschen *Multidrug-Transporter* kodieren (SAKAEDA et al. 2004). Eine der

größten Protein-Familien bilden die *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter. Sie bestehen aus mehreren Transmembrandomänen und gewinnen die für den aktiven Transport über zelluläre Membranen benötigte Energie durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) (JONES u. GEORGE 2004; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a). So können Substrate sogar entgegen eines hohen Konzentrationsgradienten transportiert werden (LITMAN et al. 2001). Transporter, die im Hinblick auf die Therapieresistenz bei Epilepsien eine wichtige Rolle spielen, sind P-glycoprotein (Pgp), einige Mitglieder der Familie der *multidrug resistance proteine* (MRP) und das *breast cancer resistance protein* (BCRP) (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a).

Der Effluxtransporter Pgp scheint dabei von besonderer klinischer Relevanz zu sein, da seine außerordentlich breite Substratspezifität viele therapeutisch genutzte Pharmaka, darunter auch AE, umfasst (SCHINKEL 1999; FROMM 2004). Humanes Pgp, ein phosphoryliertes Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa, wird ebenso wie beim Hund durch das MDR-1 Gen kodiert. Im Gegensatz hierzu kodieren bei Nagetieren zwei Gene (*mdr1a* und *mdr1b*) Pgp. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Funktionen weitestgehend denen des menschlichen Pgp entsprechen (SCHINKEL 1999). Pgp kann durch seine Expression im Gastrointestinaltrakt und luminal in kapillären Endothelzellen des ZNS sowohl die orale Absorption vieler Wirkstoffe, als auch die Aufnahme in das Nervenparenchym des Gehirns limitieren (LIN 2004). Des Weiteren bietet es Leber- und Nierengewebe Schutz, indem es Xenobiotika, die bereits in den Blutkreislauf gelangen konnten, aktiv in die Galle oder den Urin transportiert (SCHINKEL 1997; FROMM 2004). In welchem Ausmaß das ZNS einer Substanz ausgesetzt ist, wird entscheidend durch das Zusammenspiel der physikalischen Barriere der BHS und der Affinität des Substrates zu den dort lokalisierten Transportsystemen beeinflusst (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005a). Im ZNS wird Pgp unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich in kapillären Endothelzellen exprimiert. Des Weiteren konnte die Pgp-Expression in parenchymalen und perivaskulären Astrozyten nachgewiesen werden, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaß als in den Endothelzellen (SCHLACHETZKI u. PARDRIDGE 2003; VOLK et al. 2005).

Bei einigen Hunderassen wird die physiologische Schutzfunktion des Pgp an der BHS besonders eindrucksvoll deutlich. Ein genetischer Defekt des MDR-1 Gens beeinträchtigt hierbei die Funktionsfähigkeit des Transporters und führt so unter anderem zu einer Ivermectin-Überempfindlichkeit, welche sich in den Symptomen einer Neurotoxizität äußert (MEALEY et al. 2001; POTSCHKA 2009). Betroffen sind vor allem Collies, Australian Shepherds und Shetland Sheepdogs, jedoch konnten auch bei weißen Schäferhunden, Border Collies und beim Wäller Mutationen des MDR-1 Gens identifiziert werden (POTSCHKA 2009). Des Weiteren konnte in Modellen mit Pgp-*knockout*-Mäusen nachgewiesen werden, dass die mangelnde Expression des *Multidrug*-Transporters in einer deutlich erhöhten Aufnahme lipophiler Substanzen in das Gehirnparenchym resultiert (SCHINKEL et al. 1995).

Pgp wurde 1976 als erster *Multidrug*-Transporter von JULIANO und LING im Rahmen der Krebsforschung entdeckt (JULIANO u. LING 1976). 1995 konnten TISHLER et al. zum ersten Mal eine erhöhte Expression des MDR-1 Gens bei therapieresistenten Epilepsiepatienten nachweisen. Bereits damals wurde angenommen, dass eine erhöhte MDR-1 Expression zur Therapieresistenz beitragen könnte, indem die Verfügbarkeit des AE im Gehirnparenchym durch den Transporter eingeschränkt wird (TISHLER et al. 1995). In einigen darauf folgenden Studien konnten bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten erhöhte Expressionsraten des Pgp in Kapillarendothelzellen nachgewiesen werden (DOMBROWSKI et al. 2001; SISODIYA et al. 2002; ARONICA et al. 2003; LAZAROWSKI et al. 2004; KUBOTA et al. 2006; AK et al. 2007). In Astrozyten und dysplastischen Neuronen konnte ebenfalls eine Pgp-Induktion in epileptischem Gewebe festgestellt werden (SISODIYA et al. 1999; SISODIYA et al. 2002; ARONICA et al. 2003; ARONICA et al. 2004; LAZAROWSKI et al. 2004). In tierexperimentellen Studien der TLE konnten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Faktoren, die zur Hochregulation des Pgp beitragen, gewonnen werden. So wurde unter anderem festgestellt, dass die Überexpression von Pgp durch die epileptische Anfallsaktivität induziert wird (SEEGERS et al. 2002; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c). Dies geschieht lokalisiert, d.h. begrenzt auf eine bestimmte an der Entstehung und Ausbreitung der Anfallsaktivität beteiligte Gehirnregion

(POTSCHKA 2010c). Anschließend kehrt die Expression innerhalb von sieben bis 14 Tagen nach einem epileptischen Anfall auf Basalniveau zurück. Demnach erfolgt die Überexpression lediglich transient (POTSCHKA 2010a).

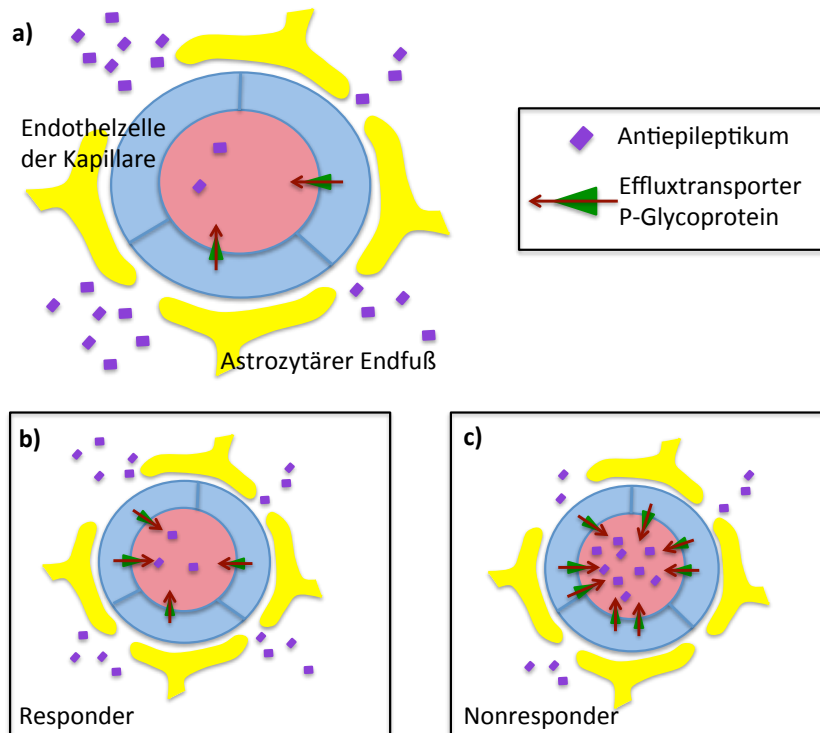


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *Multidrug*-Transporters Pgp an der BHS a) unter Normalbedingungen, b) bei pharmakosensitiven Individuen (*Responder*) und c) bei pharmakoresistenten Individuen (*Nonresponder*), modifiziert nach POTSCHKA (2010).

Unter Normalbedingungen besitzt der Effluxtransporter Pgp eine physiologische Schutzfunktion da er Xenobiotika, welche über die BHS diffundieren, aktiv zurück in den Blutstrom befördert. Durch epileptische Anfallsaktivität kommt es zu einer Expressionssteigerung des Pgp. Bei pharmakosensitiven Individuen hält sich diese in Grenzen, so dass dennoch eine ausreichende Wirkstoffkonzentration des AE im Gehirnparenchym erreicht wird. Bei pharmakoresistenten Individuen führt die gesteigerte Pgp-Expression zum erhöhten Effluxtransport des Antiepileptikums und damit zu einer ungenügenden Wirkstoffkonzentration im Nervenparenchym.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Blockade des Pgp eine verbesserte Aufnahme von AE in das Gehirn bewirkt werden kann (LÖSCHER u.

POTSCHKA 2002b, 2005b). Bei pharmakoresistenten Tieren konnte durch eine Kombination des Pgp-Inhibitors Tariquidar mit dem AE Phenobarbital eine deutliche Verbesserung des Therapieerfolges bis hin zur Anfallsfreiheit beobachtet werden (BRANDT et al. 2006; VAN VLIET et al. 2006). Die Blockade der Signalkaskade, welche zur Induktion des Pgp führt, konnte einer anfallsinduzierten Pgp-Überexpression entgegenwirken (BAUER et al. 2008; ZIBELL et al. 2009) und so zur Wiederherstellung der Pharmakosensitivität führen (SCHLICHTIGER et al. 2010; VAN VLIET et al. 2010). Die *Multidrug*-Transporter-Hypothese (pharmakokinetische Hypothese) postuliert, dass es durch die Überexpression von *Multidrug*-Transportern an der BHS zu einem erhöhten auswärtsgerichteten Transport von Arzneimitteln kommt. Dies führt dazu, dass die AE zwar eine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Blut erreichen, nicht jedoch an ihrem Zielort im Gehirnparenchym. Infolgedessen kommt es zu einer eingeschränkten Wirksamkeit der AE und damit zu einer Therapieresistenz (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c; KWAN u. BRODIE 2006; POTSCHKA 2010b).

Es konnte gezeigt werden, dass viele Therapeutika, die zur Behandlung von Epilepsien eingesetzt werden, Substrate von Pgp sind (SCHUETZ et al. 1996; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b). In der Epilepsieforschung wird jedoch davon ausgegangen, dass AE verhältnismäßig schwache Substrate von Pgp sind (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b). Demzufolge kommt es erst bei einer Überexpression des *Multidrug*-Transporters Pgp zu einer Reduktion der Wirkstoffkonzentration der AE im Gehirn (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002b, 2005b). Die Tatsache, dass therapieresistente Epilepsiepatienten meist trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen auf mehrere Antiepileptika nicht ansprechen, unterstützt diese Hypothese (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002a).

2.2.2.2 Target-Hypothese

Die meisten AE vermitteln ihren Effekt indem sie entweder die Ionenkanäle neuronaler Membranen oder die synaptische Neurotransmission beeinflussen. Auf diese Weise wird die Erregbarkeit der Nervenzellen vermindert und die Synchronisation der Neuronenverbände reduziert (ROGAWSKI u. LÖSCHER 2004). Die räumliche Ausbreitung exzitatorischer Entladungen auf benachbarte Neurone wird gehemmt, ohne die nicht-epileptische neuronale Aktivität zu stören (ROGAWSKI u. LÖSCHER 2004). Ziel der Pharmakotherapie ist dabei die Korrektur des Ungleichgewichts zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission. Obwohl sich auch AE auf dem Markt befinden, deren Wirkmechanismen noch unbekannt sind, vermitteln die meisten AE ihre Wirkung über einen oder eine Kombination der folgenden Mechanismen (ROGAWSKI u. LÖSCHER 2004):

- 1.) Modulation spannungsabhängiger Ionenkanäle: Na^+ -, Ca^{2+} - und K^+ -Ionenkanäle sind sowohl für die Aufrechterhaltung des Membranruhepotentials, als auch für die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen von großer Bedeutung. Zudem spielen sie bei der Regulation der Freisetzung von Neurotransmittern eine entscheidende Rolle und sind somit unerlässlich für die Informationsübertragung an der Synapse (ROGAWSKI u. LÖSCHER 2004).
- 2.) Intensivierung inhibitorischer Neurotransmission: Der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) entfaltet seine Wirkung im ZNS an zentralen Benzodiazepin-Rezeptoren, den GABA_A -Rezeptoren. Dabei handelt es sich um Chloridkanäle, die bei Aktivierung durch den Einstrom von Cl^- -Ionen zu einer Hyperpolarisation der Membran führen und so die Erregbarkeit der Zelle reduzieren (KWAN u. BRODIE 2006).
- 3.) Abschwächung exzitatorischer Neurotransmission: Die Wirkung des wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat wird über Kationenkanäle (AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren) vermittelt. Die Blockade dieser Glutamat-Rezeptoren führt zu einer verminderten Erregbarkeit der Zellen (BEAR et al. 2007).

Die genannten Zielstrukturen werden als *Targets* bezeichnet. Die *Target-*

Hypothese postuliert, dass die an den Ionenkanälen oder Rezeptoren auftretenden molekularen Veränderungen dieser *Targets* zu einer verminderten Sensitivität der Zielstrukturen führen (POTSCHKA 2010c). Dies verursacht ein vermindertes Ansprechen der Epilepsiepatienten auf die Therapie (REMY et al. 2003; REMY u. BECK 2006).

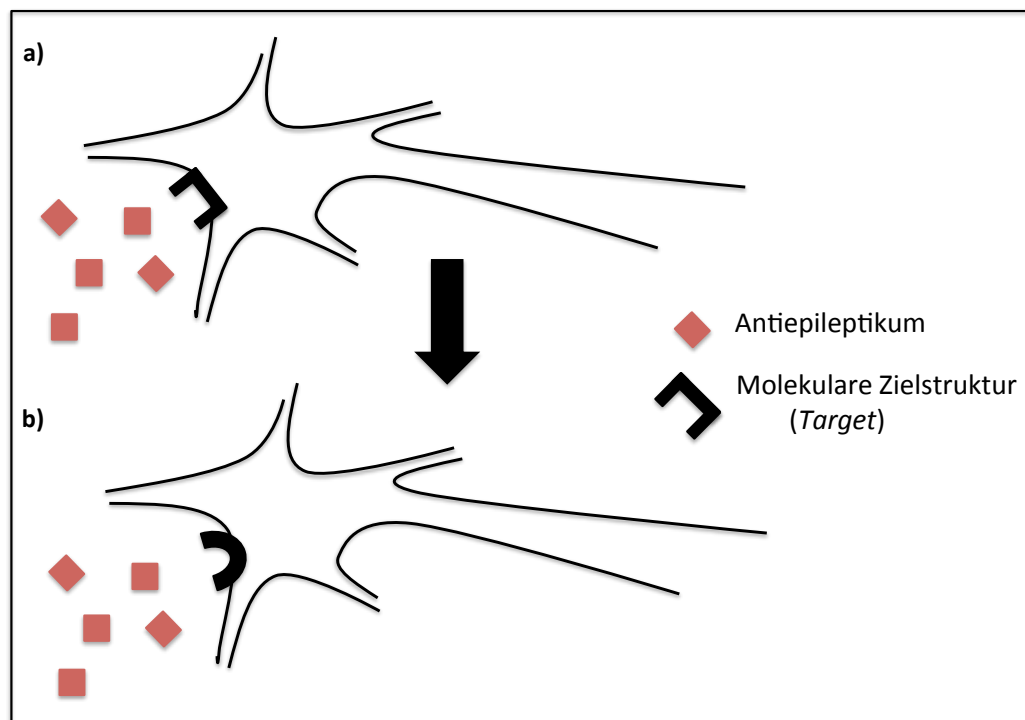


Abbildung 3: Schematische Darstellung der *Target*-Hypothese der Pharmakoresistenz bei Epilepsien, modifiziert nach REMY und BECK (2006). Bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten kommt es zu einer Veränderung der molekularen Zielstruktur des AE. Aus diesem Grund kann das AE nicht mehr seine vollständige Wirkung entfalten.

Allerdings wird diese Hypothese aufgrund des immer noch sehr unvollständigen Wissens über die tatsächlichen Wirkmechanismen von AE sowie die Tatsache, dass viele Epilepsiepatienten sich gegenüber mehreren AE mit verschiedenen primären Wirkmechanismen als pharmakoresistent erweisen, kontrovers diskutiert (KWAN et al. 2011). Experimentelle Studien weisen jedoch darauf hin,

dass Veränderungen der genannten Zielstrukturen, beispielsweise in der Untereinheiten-Zusammensetzung von Rezeptoren, zur Pharmakoresistenz bei Epilepsiepatienten beitragen können (KWAN et al. 2011).

Der GABA_A-Rezeptor ist eine Zielstruktur, an der verschiedene AE, u.a. Benzodiazepine und Barbiturate ihre Wirkung entfalten (REMY u. BECK 2006). Durch die Potenzierung GABAerger Inhibition wird die Erregbarkeit der Nervenzelle vermindert (KWAN u. BRODIE 2006). GABA_A-Rezeptoren sind Pentamere, d.h. sie setzen sich aus fünf Untereinheiten zusammen. Sie bilden einen integralen Anionenkanal, welcher für Cl⁻-Ionen und in geringerem Maße auch für Bicarbonationen (HCO₃⁻) permeabel ist (UUSI-OUKARI u. KORPI 2010). Bei Säugetieren werden die acht Untereinheiten-Klassen α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π und ρ_{1-3} , aus denen sich GABA_A-Rezeptoren zu Pentameren zusammensetzen können, von insgesamt 19 Genen kodiert (OLSEN u. SIEGHART 2008). Die meisten GABA_A-Rezeptoren setzen sich im Verhältnis 2:2:1 aus α , β , und γ -Untereinheiten zusammen (ERNST et al. 2003). Die Bindungstasche, an die der in dieser Studie verwendete Radiotracer [¹¹C]Flumazenil bindet, entspricht der Bindungsstelle der Benzodiazepine am GABA_A-Rezeptor, welche sich zwischen der $\alpha_{(1,2,3 \text{ oder } 5)}$ und der γ_2 -Untereinheit befindet (OGRIS et al. 2004).

Sowohl in experimentellen Epilepsiemodellen, als auch bei Humanpatienten wurde von Veränderungen der Anzahl, Funktion oder Pharmakologie der GABA_A-Rezeptoren berichtet (GIBBS et al. 1997; NUSSER et al. 1998; BOUILLERET et al. 2000; ANDRE et al. 2001). Des Weiteren konnten Veränderungen der GABA_A-Rezeptoren im Zusammenhang mit der verminderten Wirksamkeit GABAerger Medikamente nachgewiesen werden (HAND et al. 1997; UUSI-OUKARI u. KORPI 2010). Im Pilocarpin-Modell der TLE kam es bei epileptischen Ratten zu einem Anstieg diazepam-insensitiver GABA_A-Rezeptoren (BROOKS-KAYAL et al. 1998; COULTER 2000). Aus diesem Grund wird angenommen, dass Änderungen der Funktion sowie Pharmakologie der GABA_A-Rezeptoren im *Gyrus dentatus* in den Prozess der Epileptogenese involviert sein können (BROOKS-KAYAL et al. 1998; COULTER 2000; COHEN et al. 2003). Die Ergebnisse einer Studie von VOLK et al., in der Veränderungen der GABA_A-Rezeptoren bei pharmakosensitiven und pharmakoresistenten epileptischen Ratten autoradiographisch untersucht

wurden, gibt Hinweise darauf, dass solche Veränderungen der GABA_A-Rezeptoren auch zur Pharmakoresistenz bei TLE beitragen können (VOLK et al. 2006). Auf Rezeptor-Ebene hängen Abnormalitäten im epileptischen Gehirn vermutlich unmittelbar mit der veränderten Expression der Gene, welche die Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors kodieren, zusammen (RICE et al. 1996; SCHWARZER et al. 1997; BROOKS-KAYAL et al. 1998; LOUP et al. 2000). Zudem konnten sowohl im Pilocarpin- als auch im Kainat-SE-Modell mittels *in-situ*-Hybridisierung Unterschiede in der Expression mehrerer GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten belegt werden (BROOKS-KAYAL et al. 1998; SPERK et al. 1998). Dies war ebenfalls im elektrischen SE-Modell der Fall (LAUREN et al. 2003). In der vorliegenden Studie wurde der *Tracer* [¹¹C]Flumazenil verwendet, um mithilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sowohl Veränderungen in der Untereinheiten-Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren, als auch die Funktion bzw. Expression des *Multidrug*-Transporters Pgp zu untersuchen. Des Weiteren wurde die γ_2 -Untereinheit immunhistochemisch untersucht. Diese ist von besonderem Interesse, da sie Teil aller natürlich vorkommenden postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren zu sein scheint und essentiell für die Formierung der Benzodiazepin-Bindungsstelle *in vivo* ist (GÜNTHER et al. 1995; SCHWEIZER et al. 2003). Ferner wurde von diversen Mutationen der γ_2 -Untereinheit berichtet, welche zu febrilen Anfällen sowie generalisierten Epilepsien bei Menschen führten (BAULAC et al. 2001; WALLACE et al. 2001; HARKIN et al. 2002; JACOB et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust der γ_2 -Untereinheit einer Epilepsie ursächlich zugrunde liegen kann (SCHWEIZER et al. 2003). Ferner wies eine Studie, in der mehrere Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors immunhistochemisch nachgewiesen wurden darauf hin, dass es bei pharmakoresistenten Ratten (*Nonrespondern*) im *Gyrus dentatus* zu einer verminderten γ_2 -Expression verglichen mit der Gruppe der pharmakosensitiven Ratten (*Responder*) kam (BETHMANN et al. 2008).

2.2.3 Inflammation und Mikroglia

Da im Gehirn nicht die klassischen Entzündungssymptome auftreten, wie es in anderen Körperteilen der Fall ist, wurde das Gehirn lange Zeit als immunprivilegiertes Organ betrachtet (VEZZANI et al. 2011b). Die beobachtete Toleranz des Gehirns gegenüber Transplantaten (BILLINGHAM u. BOSWELL 1953) wurde als Status immunologischer Ignoranz gedeutet (BECHMANN 2005). Durch die Existenz der BHS als Barriere sowie durch Abwesenheit klassischer lymphatischer Drainagewege nahm man an, das Gehirn sei von der Immunfunktion des Organismus ausgenommen (MEDAWAR 1948). Auch die Beobachtung, dass z.B. Herpesviren in Ganglienzellen persistieren können, da eine Elimination der Viren zu schweren neurologischen Defiziten führen würde, deutete auf das Prinzip des Immunprivilegs hin, was sich in einer reduzierten Aktivierbarkeit des Immunsystems äußert (KWIDZINSKI et al. 2003).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Gehirn keinesfalls immunologisch inaktiv ist. Mikrogliazellen, Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen der BHS sind in der Lage sowohl proinflammatorische, als auch antiinflammatorische Mediatoren zu synthetisieren (VEZZANI et al. 2011b). Auch periphere Zellen, welche unter bestimmten Bedingungen in das Gehirnparenchym einwandern können, sind dazu in der Lage (VEZZANI u. FRIEDMAN 2011). Das Verhalten der Mikrogliazellen und Astrozyten kann inflammations-ähnlichen Charakter zeigen (CHING et al. 2012). Insbesondere Mikrogliazellen spielen bei neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Prozessen eine bedeutende Rolle (DOORDUIN et al. 2008). Mikrogliazellen sind die stationären Immunzellen des ZNS beim Säugetier und können nach Aktivierung als phagozytierende Makrophagen fungieren (TURRIN u. RIVEST 2006). Diese Zellen sind sowohl in physiologische Prozesse wie die Wiederherstellung der Gewebeintegrität nach Verletzungen, als auch in pathophysiologische Prozesse, wie die Progression neurodegenerativer Erkrankungen involviert (CZECH et al. 2011). Es werden insbesondere zwei Zustandsformen der Mikrogliazellen unterschieden, obwohl auch Zwischenformen vorkommen (LYNCH 2009). Überwachende Mikrogliazellen, früher als ruhend bezeichnet, zeigen keine Motilität, minimale

Expression von Zelloberflächenantigenen und schütten kaum Zytokine oder Chemokine aus (LYNCH 2009). Sie zeichnen sich durch ihre ramifizierte Form, d.h. durch einen kleinen Zellkörper mit langen schmalen Fortsätzen aus und herrschen im gesunden, erwachsenen ZNS vor (KETTENMANN et al. 2011). Sie überwachen aktiv ihre unmittelbare Umgebung und reagieren sehr sensitiv auf jegliche Art von potentieller Bedrohung in Form verschiedener Noxen, die auf das ZNS einwirken (WINKELER et al. 2010). Pathologische Ereignisse infektiöser, degenerativer, metabolischer oder ischämischer Natur können neuroinflammatorische Prozesse induzieren (CHING et al. 2012). Solche Risikofaktoren, die zur Entwicklung einer Epilepsie führen können, sind beispielsweise Traumen, virale Infektionen, Schlaganfälle, Fieberanfälle und SE (TEMKIN 2009). Es konnte gezeigt werden, dass es im Anschluss an solche proepileptogenen Geschehnisse zu einer raschen Aktivierung von Gliazellen, sowie zur Ausschüttung proinflammatorischer Substanzen kommt (RAVIZZA et al. 2011). Durch Stressoren unterschiedlicher Art werden Mikrogliazellen aktiviert und verändern ihren Phänotyp (HANISCH u. KETTENMANN 2007). Sie nehmen amöboide Formen an, proliferieren, migrieren zum Ort der Läsion und betreiben Phagozytose (CZEH et al. 2011). Zudem sind aktivierte Mikrogliazellen in der Lage pro- und antiinflammatorische Zytokine und Chemokine zu sezernieren, ebenso wie Stickstoffmonoxid (NO) und Wachstumsfaktoren als stress-induzierende Mediatoren (GRAEBER u. STREIT 2010). Durch Phagozytose von eingedrungenen Mikroorganismen oder Zelldebris nach Verletzungen und durch die Produktion antiinflammatorischer Moleküle sowie neurotropher Faktoren können Mikroglia neuroprotektive Effekte aufweisen (RUPPRECHT et al. 2010). Ein Inflammationsgeschehen kann somit durchaus neuroprotektiv sein (LIESZ et al. 2009). Dies trifft besonders hinsichtlich der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Homöostase in der unmittelbaren Umgebung der Neurone zu (WALTER u. NEUMANN 2009). Neben ihren neuroprotektiven Eigenschaften können Mikrogliazellen jedoch auch neurotoxische Auswirkungen haben, und durch die Induktion neuronalen Zelltodes in die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen involviert sein (CZEH et al. 2011). Welche Faktoren entscheidend sind, um Mikrogliazellen in Helfer mit neuroprotektiven

Eigenschaften oder in Aggressoren mit Zerstörungspotential zu wandeln, sind Gegenstand aktiver Forschungsarbeiten, nicht zuletzt da die Beeinflussung solcher Faktoren eine therapeutische Strategie zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen bieten könnte (CZECH et al. 2011). Art und Dauer eines Insultes, das unmittelbare Umfeld, Interaktionen mit anderen Zelltypen und sogar das Alter eines Organismus können Einfluss auf die Art der Aktivierung nehmen (WALTER u. NEUMANN 2009). Es werden zumindest zwei verschiedene Wege der Aktivierung von Mikrogliazellen unterschieden (MOSSER u. EDWARDS 2008). Tatsächlich scheint die Frage ob Mikroglia zerstörerisch oder neuroprotektiv sind von ihrem Aktivitätsstatus abzuhängen, welcher wiederum durch das umgebende Milieu beeinflusst wird (SCHWARTZ u. SHECHTER 2010). Die klassische Aktivierung durch Lipopolysaccharide (Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien, LPS) und das proinflammatorische Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) führt zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, Proteasen und oxidativer Metaboliten wie Stickoxide und Superoxide (CZECH et al. 2011). Auf diese Art aktivierte Gliazellen sind entscheidend für die Abwehr von Pathogenen und Tumorzellen, können jedoch auch gesunde Zellen wie Neuronen und Gliazellen schädigen (CZECH et al. 2011). Im Gegensatz dazu können Mikrogliazellen durch Interleukin-4 (IL-4) und IL-13 auf alternative Art aktiviert werden, was zu einer Herunterregulation von Inflammediatoren führt und somit zur Angiogenese und Gewebereparatur beiträgt (CZECH et al. 2011).

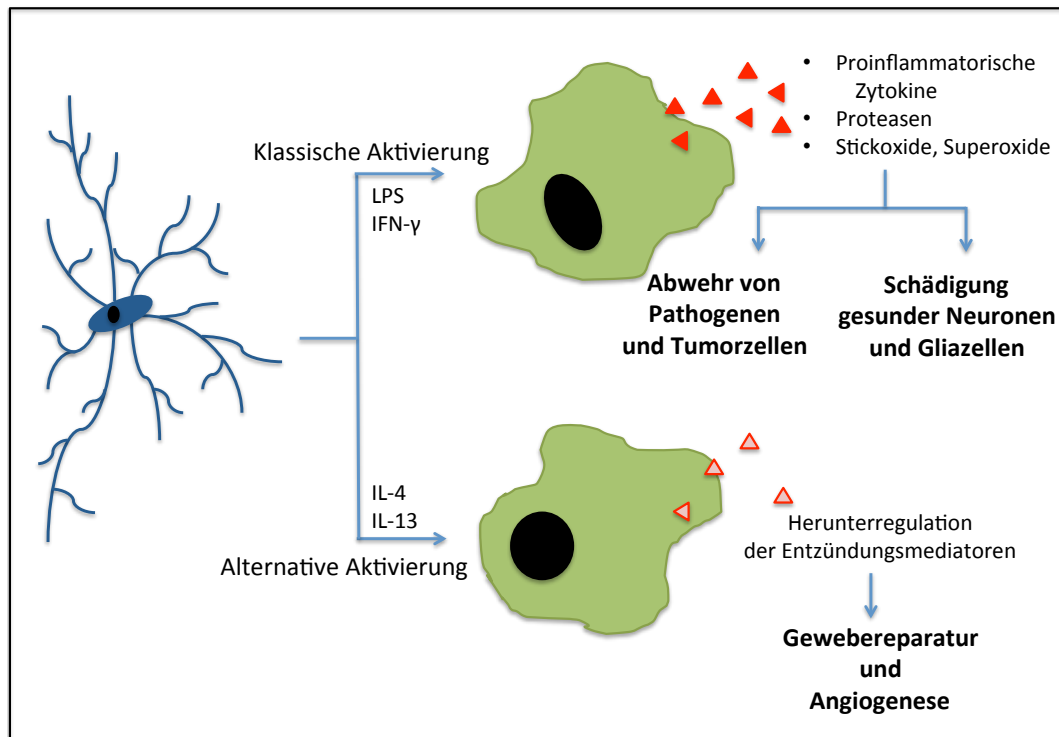


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Mikroglia-Aktivierung (modifiziert nach CZECH et al. 2011). Ramifizierte Mikrogliazellen (in der Abbildung links) überwachen aktiv ihre unmittelbare Umgebung und reagieren sehr sensitiv auf potentielle Gefahren. Abhängig von verschiedenen Arten der Aktivierung können Mikrogliazellen zerstörerische oder neuroprotektive Eigenschaften aufweisen.

Immer mehr Studien weisen darauf hin, dass Inflammationsgeschehen und Autoimmunkrankheiten Auslöser für Epilepsien und epileptische Anfälle sein können. Multiple Sklerose, Vaskulitis und systemischer Lupus können als Autoimmunerkrankungen wiederkehrende Anfälle auslösen (NAJJAR et al. 2008). Auch die Rasmussen-Enzephalitis, eine schwer verlaufende Form der Epilepsie, bei der es zur Atrophie einer Gehirnhemisphäre kommt, wurde mit Autoantikörpern, welche das Gehirngewebe angreifen, in Verbindung gebracht (WATSON et al. 2004). Das Gehirngewebe solcher Patienten wies Anzeichen von Inflammation, wie reaktive Astrozytose, aktivierte Mikrogliazellen, proinflammatorische Mediatoren und Infiltration des Gewebes durch Lymphozyten auf (PARDO et al. 2004). Des Weiteren kommt es bei Krankheiten, welche mit Autoantikörpern assoziiert sind, häufig zu SE, psychiatrischen

Komorbiditäten und schweren, therapieresistenten Epilepsien. (VEZZANI et al. 2011b). Da die Autoantikörper das eigene Gehirngewebe angreifen, erweist sich bei solchen Epilepsiepatienten häufig eine Immuntherapie als effektiver als die gewöhnlichen AE (VINCENT et al. 2010). Auch nach Resektion des epileptogenen Fokus bei Humanpatienten mit therapieresistenten Epilepsien unterschiedlicher zugrunde liegender Pathologie, konnten Hinweise auf inflammatorisches Geschehen gefunden werden (VEZZANI et al. 2011a). So konnten unter anderem reaktive Astrozytose, proinflammatorische Moleküle und aktivierte Mikrogliazellen im Hippocampus von TLE-Patienten (ARONICA et al. 2007; RAVIZZA et al. 2008), sowie im Zusammenhang mit kortikalen dysplastischen Läsionen (IYER et al. 2010) nachgewiesen werden. In Kontrollgewebe gesunder Personen zeigten sich keine dieser Anzeichen für Inflammation (CRESPER et al. 2002; ARONICA et al. 2007). Zudem weisen Tierversuche darauf hin, dass Inflammationsgeschehen im Gehirn zu Übererregbarkeit, und damit zur Entstehung epileptischer Anfälle beiträgt (VEZZANI et al. 2011b). Im Anschluss an proepileptogene Vorfälle wie z.B. Trauma, Schlaganfall, virale Infektion, Fieberanfall oder SE kommt es zur raschen Aktivierung von Mikrogliazellen und damit verbundener Ausschüttung proinflammatorischer Substanzen (TEMKIN 2009; RAVIZZA et al. 2011).

Derzeit wird an der Entwicklung nicht-invasiver bildgebender Verfahren gearbeitet, um Inflammationsgeschehen im Gehirn zu detektieren und zu quantifizieren (VEZZANI et al. 2011b). Dies könnte sich positiv auf die Diagnostik, sowie die Einschätzung der Prognose und die Therapie von Erkrankungen des ZNS auswirken (VEZZANI u. FRIEDMAN 2011).

Bei dem *translocator protein* (TSPO) handelt es sich um einen Rezeptor, der im gesunden Gehirn nur in geringem Maße exprimiert wird, bei Verletzungen und Entzündungsgeschehen jedoch deutlich heraufreguliert wird (VENNETI et al. 2009). Dieser Expressionsanstieg korreliert mit dem Ausmaß der Mikrogliaaktivierung nach einem solchen Insult (SCARF u. KASSIOU 2011). Aus diesem Grund bietet die Messung der TSPO-Expression eine Möglichkeit, Schweregrad und Fortschreiten inflammatorischer Krankheitsprozesse zu untersuchen (CHING et al. 2012). Da Inflammationsgeschehen im Gehirn

vermutlich einer der Mechanismen ist, der neuronaler Hyperexzitabilität zugrunde liegt, könnte es sich als nützlicher Biomarker erweisen, um Fortschreiten und Schweregrad von Epilepsien zu beurteilen. Es ist möglich, dass dadurch eine Verbesserung der Diagnostik, sowie Einschätzung der Prognose und der Therapie zu erreichen ist (VEZZANI u. FRIEDMAN 2011).

Entdeckt wurde TSPO, zunächst als peripherer Benzodiazepinrezeptor (PBR) bezeichnet, 1977 in der Niere als alternative Bindungsstelle für das Benzodiazepin Diazepam (BRAESTRUP u. SQUIRES 1977). Durch neue Erkenntnisse über Struktur und Funktion, wurde 2006 die Nomenklatur geändert und der PBR in TSPO umbenannt (PAPADOPOULOS et al. 2006). Als ein Protein von 80 kDa mit fünf Transmembrandomänen bildet TSPO einen Teil der *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) und ist vorwiegend in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (SCARF et al. 2009). Mindestens zwei weitere Untereinheiten sind an der Bildung der MPTP beteiligt, welche sowohl mit der inneren als auch der äußeren Mitochondrienmembran in Kontakt steht, und so die Passage lipophiler Moleküle über den Zwischenraum der beiden Mitochondrienmembranen erleichtert (CHING et al. 2012). Diese sind ein spannungsabhängiger Anionenkanal von 32 kDa (*voltage dependent anion channel*, VDAC) und ein Adenin Nukleotid Transporter von 30 kDa (*adenine nucleotide transporter*, ANT) (SCHWEITZER et al. 2010). In geringerem Ausmaß ist TSPO auch im Zellkern und in der Plasmamembran zu finden (CHING et al. 2012). TSPO spielt eine wichtige Rolle in der Synthese von Steroidhormonen und Gallensalzen, indem es Cholesterol bindet und in die Mitochondrien transportiert (CHING et al. 2012). Außerdem ist TSPO direkt oder indirekt in zelluläre Funktionen wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose involviert, u.a. indem es Proteine für die Biosynthese von Membranen importiert und Anionen transportiert (FAN et al. 2009). Eine weitere Aufgabe besteht in der Regulation mitochondrialer Funktionen, sowie dem Transport von Porphyrinen für die Häm-Biosynthese (BATARSEH u. PAPADOPOULOS 2010). Besonders reich an TSPO sind unter Normalbedingungen Gewebe, in denen Steroidsynthese stattfindet (BATARSEH u. PAPADOPOULOS 2010). Dies sind insbesondere die Nebennieren, die Epiphyse, die Speicheldrüsen, olfaktorisches Epithel und die Gonaden

(PAPADOPOULOS et al. 2006). In der Leber und im Gehirn ist TSPO nur in geringen Mengen vorhanden, während die Niere und das Myokard intermediäre Mengen an TSPO aufweisen (GIATZAKIS u. PAPADOPOULOS 2004). Generell ähnelt die Gewebeverteilung von TSPO in Nagetieren der des Menschen (ROIVAINEN et al. 2009).

Der *Tracer* [^{11}C]PK11195, der im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens getestet wurde, stellt einen Liganden des TSPO dar. Somit bietet er die Möglichkeit, Inflammationsgeschehen anhand der Messung der TSPO-Expression zu untersuchen.

2.3 Positronen-Emissions-Tomographie

2.3.1 Aufbau und Funktionsprinzipien

Der Begriff Positronen-Emissions-Tomographie (PET) leitet sich aus dem Lateinischen (positron = positiv geladenes Elementarteilchen; emissio = aussenden) sowie dem Altgriechischen (τομή, *tome* = Schnitt und γράφειν, *graphein* = schreiben) her. Dabei handelt es sich um ein nicht-invasives Schnittbildverfahren, durch das die örtliche Verteilung eines inkorporierten Radiopharmakons dreidimensional abgebildet werden kann (CHING et al. 2012). Auf diese Weise können biochemische und physiologische Prozesse bildlich dargestellt werden (VENNETI et al. 2012). Nach Applikation einer radioaktiv markierten Substanz tritt Gammastrahlung auf, die mithilfe geeigneter Detektoren gemessen wird (PIMLOTT u. SUTHERLAND 2011). Am häufigsten wird dazu eine Gammakamera mit einem nach dem Anger-Prinzip aufgebauten Messkopf verwendet (GEWORSKI et al. 2005). Der Detektorteil des Messkopfes besteht aus einem Einzelkristall (Szintillator), welcher die Energie der aus dem Patienten austretenden Strahlung in eine Lichtemission (Szintillation) umsetzt (KAUFFMANN et al. 2011). Dieses Szintillationslicht wird mithilfe von *Photomultipliern* (Sekundärelektronenvervielfacher, SEV) in ein elektrisches Signal umgewandelt (KAUFFMANN et al. 2011). Mithilfe der Ortungs- und Zählelektronik kann die Energie der γ -Quanten sowohl gemessen, als auch ortsrichtig gespeichert werden (GEWORSKI et al. 2005). Während die Aktivitätsverteilung bei der planaren Aquisition als zweidimensionales Bild aufgenommen wird, lässt sich ein dreidimensionales Objekt in einen Stapel von zweidimensionalen Scheiben zerlegen (GEWORSKI et al. 2005). Um daraus ein dreidimensionales Bild berechnen zu können, sind eine Vielzahl von Messungen aus unterschiedlichen Winkeln nötig (VENNETI et al. 2012). Dies erfordert entweder um den Patienten rotierende Detektoren oder einen den Patienten umgebenden Detektorring (CHING et al. 2012). Die tomographische Information wird bei der PET aus der Koinzidenzmessung der Vernichtungsstrahlung gerichteter Paare von γ -Quanten gewonnen (MOHNIKE et al. 2011).

Vernichtungsstrahlung entsteht, wenn Positronen-emittierende Nuklide zerfallen und dabei Positronen aussenden (CHING et al. 2012). Wenn ein solches Positron auf ein Elektron trifft, werden beide Teilchen vernichtet (Annihilation) (PIMLOTT u. SUTHERLAND 2011; VENNETI et al. 2012). Die Masse der beiden Teilchen wird in Energie umgewandelt, wobei immer Paare von γ -Quanten gleichzeitig in einem Winkel von 180 Grad zueinander emittiert werden (KRAMME 2011). Indem gegenüberliegende Detektoren gleichzeitig (koinzident) jeweils einen der beiden γ -Quanten der Vernichtungsstrahlung registrieren, findet eine elektronische Kollimation statt (PIMLOTT u. SUTHERLAND 2011). Der Messstrahl (Koinzidenzlinie, *line of response*, LOR) stellt die Verbindungslinie der beiden Stellen dar, auf denen die γ -Quanten auftreffen (KUWERT 2007). Der Emissionsort der Strahlung befindet sich demnach auf dem Messstrahl. Die Aktivitätsverteilung im Patienten kann rekonstruiert werden, wenn viele Detektoren kreisförmig um die zu messende Aktivitätsverteilung, also um den Patienten, angeordnet sind (WINTERMANTEL u. SUK-WOO 2009). Abschwächung, Streuung sowie Zufallsereignisse müssen dabei von der wahren Koinzidenz unterschieden werden. Bei der gestreuten Koinzidenz (*true scattered coincidence*) kommt es zur Streuung eines oder beider γ -Quanten des Zerfallsereignisses. Dadurch wird eine falsche LOR rekonstruiert (GEWORSKI et al. 2005). Wenn zwei nicht korrelierte γ -Quanten von verschiedenen Zerfallsereignissen zufällig gleichzeitig registriert werden, entsteht ebenfalls eine LOR, die auf ein Zerfallsereignis hinweist, das nicht stattgefunden hat. Dieser Fall wird als zufällige Koinzidenz (*random coincidence*) bezeichnet (GEWORSKI et al. 2005). Zur Bildrekonstruktion müssen die erwünschten wahren Koinzidenzereignisse (*true unscattered coincidence*) herausgefiltert und von den unerwünschten gestreuten sowie zufälligen Koinzidenzereignissen getrennt werden (GEWORSKI et al. 2005). Da gestreute Quanten im Vergleich zu ungestreuten Quanten eine niedrigere Energie aufweisen, wird nicht nur die zeitliche Übereinstimmung zweier Ereignisse und der Auftreffort auf dem Kristall registriert, sondern auch die Energie der Quanten berücksichtigt (Energiediskriminierung) (PIMLOTT u. SUTHERLAND 2011). Um die Abschwächung (*attenuation*) durch Absorption im Gewebe auszugleichen, wird

ein Transmissionsscan durchgeführt (MOHNIKE et al. 2011). Mithilfe dieses Scans können entlang jeder LOR die Schwächungseigenschaften des Gewebes quantifiziert werden (GEWORSKI et al. 2005). Die Effekte der Abschwächung, der Zufallsereignisse und der Streuung können demnach rechnerisch und messtechnisch korrigiert werden (KNOLL 2012).

2.3.2 Radiopharmaka und deren klinische Anwendung

Bei einem Radiopharmakon handelt es sich um eine Verbindung einer nicht radioaktiven Trägersubstanz mit einem Radionuklid (KRAMME 2004). Beim radioaktiven Zerfall instabiler Isotope gehen die Atomkerne spontan in energetisch günstigere Energiezustände über und emittieren dabei Strahlung (VENNETI et al. 2012). Ein Molekül kann markiert werden indem ein Teil der stabilen Isotope durch radioaktive Isotope ersetzt wird (ZEECK et al. 2005). Da verschiedene Isotope eines Elements die gleichen chemischen Eigenschaften besitzen, können radioaktiv markierte Moleküle in den Stoffwechsel eingeschleust werden (MOHNIKE et al. 2011). Der Organismus kann diese instabilen Isotope in der Regel nicht von den entsprechenden nicht-radioaktiven Molekülen unterscheiden (PIMLOTT u. SUTHERLAND 2011). Somit kann deren Weg im Organismus durch Messung der Radioaktivität verfolgt werden (SCHWEITZER et al. 2010). Aus diesem Grund werden Radiopharmaka auch als *Tracer* bezeichnet. Die Bildaufnahme, die anschließend aus den gewonnenen Daten rekonstruiert wird, gibt die Lokalisation und Konzentration des *Tracers* wieder. Dies ermöglicht die Darstellung von Stoffwechselvorgängen im dreidimensionalen Objekt (CHING et al. 2012). Je nachdem für welchen Zweck ein Radiopharmakon eingesetzt werden soll, kommt dessen Beteiligung an physiologischen, pathophysiologischen und biochemischen Funktionen im Organismus eine besondere Bedeutung zu. Dadurch wird die Visualisierung und Quantifizierung von Rezeptoren, Transportern, Enzymen und anderen molekularen Zielstrukturen ermöglicht (SCHICHA u. SCHOBER 2007). Die am häufigsten eingesetzten Radionuklide sind ^{18}F (Fluor), ^{13}N (Stickstoff), ^{15}O

(Sauerstoff) und ^{11}C (Kohlenstoff) (MOHNIKE et al. 2011).

Besonders in der Onkologie, Kardiologie und Neurologie ist die klinische Anwendung der PET mithilfe geeigneter *Tracer* eine Untersuchungsmethode von unschätzbarem Wert (CHING et al. 2012). Zudem kommt ihr bei der Darstellung von Inflammationsgeschehen eine große Bedeutung zu (BARTELS et al. 2010). Ihr Einsatz zur Verbesserung der Diagnostik, Therapieplanung und Therapiekontrolle ermöglicht eine individualisierte patientenspezifische Therapieanpassung, und bildet somit die Grundlage für ein optimales Patientenmanagement.

2.3.2.1 [^{18}F]Fluorodeoxyglucose

Den am häufigsten verwendeten *Tracer* stellt derzeit [^{18}F]Fluorodeoxyglucose (^{18}FDG) dar (PIMLOTT u. SUTHERLAND 2011). Analog zu Glukose wird ^{18}FDG über Glukosetransporter in die Zellen aufgenommen und dort phosphoryliert. Da das dabei entstehende [^{18}F]FDG-6-phosphat nicht weiter verstoffwechselt wird, kann es die Zelle nicht verlassen (BARTEL u. ZIESSMANN 2010). Dieser als *metabolic trapping* bezeichnete Vorgang führt zu einer vermehrten Anreicherung der Substanz in den Zellen, die einen hohen Metabolismus aufweisen (PIMLOTT u. SUTHERLAND 2011). Dieser *Tracer*, mit dessen Hilfe der regionale Glukoseverbrauch in verschiedenen Geweben evaluiert werden kann, wird zur Lokalisation von Tumoren, zur Rezidivdiagnostik, zur Einschätzung der Prognose durch *Staging* und zur Darstellung des Metastasierungsverhaltens verschiedener Krebserkrankungen angewendet (RICE et al. 2011). Außerdem findet ^{18}FDG sowohl in kardiologischen als auch neurologischen Fragestellungen breite Anwendung (CHING et al. 2012). Durch die Darstellung des Glukosemetabolismus können nicht nur Rückschlüsse auf die myokardiale Vitalität und Funktionalität gezogen werden, sondern auch funktionsgestörte Myokardabschnitte lokalisiert werden (BENGEL et al. 2009).

Im Gehirn wird die Messung des regionalen Glukoseverbrauchs diagnostisch zur Auffindung des epileptogenen Fokus bei Epilepsiepatienten und zur Abwägung von Nutzen bzw. Risiko operativer Eingriffe genutzt (GOFFIN et al. 2008). Zudem

wird sie zur frühzeitigen Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen wie *Morbus Alzheimer* oder *Morbus Parkinson* eingesetzt (HAENSE et al. 2009). Des Weiteren tritt eine erhöhte ^{18}F FDG-Anreicherung bei Inflammationsprozessen auf (BARTEL u. ZIESSMANN 2010).

In der vorliegenden Studie stand die Untersuchung der Unterschiede zwischen pharmakosensitiven und pharmakoresistenten Tieren im Vordergrund. Zudem diente der ^{18}F FDG-Scan zur Bestimmung der zu untersuchenden Regionen (*regions of interest*, ROI) im Rattengehirn (siehe Kap. 4.2.3).

2.3.2.2 [^{11}C]Flumazenil

Bereits 1984 wurde eine Methode entwickelt, um den Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil (ethyl-8-fluoro-5,6-dihydro-5- ^{11}C methyl-6-oxo-4H-imidazol[1,5-a][1,4]benzodiazepine-3-carboxylate; RO 15.1788 ^{11}C) mit radioaktivem Kohlenstoff ^{11}C zu markieren (MAZIERE et al. 1984). Es stellte sich heraus, dass [^{11}C]Flumazenil für *in vivo* Studien zur Erforschung der Benzodiazepin-Rezeptoren mittels PET angewendet werden kann (MAZIERE et al. 1984). Unter anderem wurde dieser *Tracer* zur Untersuchung des zentralen Benzodiazepin-Rezeptors, d.h. des GABA_A-Rezeptors bei ischämischem Schlaganfall (HEISS et al. 2000; HEISS et al. 2004), Angelmann-Syndrom (MONCLA et al. 1999; HOLOPAINEN et al. 2001) und frühzeitiger Erblindung (SANABRIA-BOHORQUEZ et al. 2001) herangezogen. Da [^{11}C]Flumazenil mit hoher Affinität und Selektivität an die Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors bindet (BARTENSTEIN u. KOEPP 1995; SYVÄNEN et al. 2011), fand es zudem breite Anwendung sowohl in Tiermodellen der TLE (HAND et al. 1997; ROCHA u. ONDARZA-ROVIRA 1999), als auch in klinischen Studien am Humanpatienten zur Untersuchung verschiedener Formen der Epilepsie (PREVETT et al. 1995; DUNCAN 1999; LAMUSUO et al. 2000; BORBELY 2001). Insbesondere im Rahmen der präoperativen Evaluierung von Epilepsiepatienten findet [^{11}C]Flumazenil derzeit klinischen Einsatz zur Lokalisation des epileptogenen Fokus sowie der Untersuchung GABAerger Funktion (FROKLAGE et al. 2012). Des Weiteren konnte

gezeigt werden, dass [^{11}C]Flumazenil ein Substrat des Effluxtransporters Pgp darstellt (ISHIWATA et al. 2007). Aus diesem Grund spiegelt die Anreicherung des *Tracers* [^{11}C]Flumazenil nicht nur die Eigenschaften des GABA_A-Rezeptors, sondern ebenfalls die Aktivität des Pgp wider (FROKLAGE et al. 2012). In der vorliegenden Studie wurde [^{11}C]Flumazenil eingesetzt, um sowohl Veränderungen in der Untereinheiten-Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors, als auch die Funktion des *Multidrug*-Transporters Pgp zu untersuchen. Von besonderem Interesse war hierbei die Überprüfung der Eignung von [^{11}C]Flumazenil als PET-*Tracer* zur Darstellung von Unterschieden zwischen pharmakosensitiven und pharmakoresistenten Tieren.

2.3.2.3 [^{11}C]PK11195

Bei dem *Tracer* [^{11}C]PK11195 (1[2-chlorophenyl]-N-methyl-N-[1-methyl-propyl]-3-isoquinolone carboxamide) handelt es sich um einen pharmakologischen Antagonisten des *translocator protein* (TSPO) (VENNETI et al. 2012). Da TSPO (siehe Kap. 2.2.3) insbesondere von aktivierten Mikrogliazellen exprimiert wird, ist es im gesunden Gehirn nur in geringem Maße vorzufinden (SCHWEITZER et al. 2010). Jedoch kommt es bei akuten inflammatorischen und neurodegenerativen Prozessen im ZNS zu einer Expressionssteigerung des TSPO aufgrund der Aktivierung von Mikrogliazellen (SCARF u. KASSIOU 2011). Die indirekte Messung der TSPO-Expression mithilfe geeigneter *Tracer* und der PET bietet somit die Möglichkeit, den Schweregrad und das Fortschreiten inflammatorischer Krankheitsprozesse im ZNS zu untersuchen (CHING et al. 2012).

[^{11}C]PK11195 wurde sowohl in tierexperimentellen als auch in klinischen Studien am Humanpatienten bereits zur Untersuchung verschiedenster neurologischer Erkrankungen eingesetzt (VENNETI et al. 2006; OWEN u. MATTHEWS 2011; VENNETI et al. 2012). Insbesondere zur Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen wie Multiple Sklerose (BANATI et al. 2000; OH et al. 2011), *Morbus Parkinson* (OUCHI et al. 2005; BARTELS et al. 2010), *Morbus Alzheimer* (EDISON et al. 2008) und *Morbus Huntington* (POLITIS et al. 2011) fand [^{11}C]PK11195

breite Anwendung. Zur Untersuchung der Rasmussen-Enzephalitis, einer schwer verlaufenden Form der Epilepsie, bei der es im Krankheitsverlauf zur Atrophie einer Gehirnhemisphäre kommt, wurde ebenfalls [^{11}C]PK11195 eingesetzt (BANATI et al. 1999). Immer mehr Studien weisen darauf hin, dass Inflammationsgeschehen und Mikrogliaaktivierung auch im Hinblick auf die Krankheit Epilepsie eine entscheidende Rolle spielen (VEZZANI et al. 2011a; VEZZANI et al. 2011b). Im Zusammenhang mit Epilepsieerkrankungen wurde jedoch bisher nur bei wenigen Patienten versucht, Neuroinflammation bildgebend darzustellen (JACOBS u. TAVITIAN 2012). Eine Anreicherung des Tracers [^{11}C]PK11195 konnte in Regionen des epileptischen Fokus nachgewiesen und mithilfe von MRT, EEG und ^{18}F FDG-PET verifiziert werden (BUTLER et al. 2011). Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens wurde der PET-Tracer [^{11}C]PK11195 hinsichtlich seiner Eignung zur Darstellung der Pharmakoresistenz bei epileptischen Ratten geprüft.

3 Zielsetzung und Arbeitshypothesen

Zur Therapie von Epilepsien steht eine Vielzahl von Antiepileptika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung. Dennoch kann nicht bei allen Patienten eine zufriedenstellende Kontrolle der Anfälle erreicht werden. Für die betroffenen Epilepsiepatienten kann dies eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität zur Folge haben. Das Wissen um die Diagnose, die epileptischen Anfälle selbst und die damit verbundenen Gefahren erschweren das Leben der Patienten. Zudem können epilepsie-assoziierte psychiatrische Komorbiditäten sowie kognitive Defizite eine enorme zusätzliche Belastung darstellen. Bei Nichtansprechen auf eine Therapie führt jeder erfolglose medikamentelle Therapieversuch mit einem weiteren Medikament zu erneuter Enttäuschung, Entmutigung und zu unerwünschten Nebenwirkungen. Bei therapieresistenten Veterinärpatienten kommt es nicht selten zur Euthanasie. Eine frühzeitige Identifizierung pharmakoresistenter Epilepsien würde eine optimierte individualisierte Therapieplanung ermöglichen. Dadurch könnten erfolglose Therapieversuche sowie die damit verbundenen Belastungen vielen Patienten erspart bleiben. Demnach wäre ein Vorgehen wünschenswert, durch welches auf nicht-invasive Art und Weise individuell für jeden Patienten festgestellt werden kann, ob eine Pharmakoresistenz vorliegt, welcher Mechanismus ihr zugrunde liegt und welche Therapie sich demnach am besten eignet. Durch eine individuelle, auf klinischen Befunden basierende Nutzen-Risiko-Abwägung könnte zudem die Prognose besser eingeschätzt, sowie frühzeitig auf alternative Behandlungsmöglichkeiten umgestiegen werden.

Zur Erklärung der Mechanismen, welche der Therapieresistenz bei Epilepsien zugrunde liegen, wurden unter anderem die *Target*-Hypothese und die *Multidrug*-Transporter-Hypothese formuliert. Die *Target*-Hypothese begründet die Pharmakoresistenz in molekularen Veränderungen der Zielstrukturen von Antiepileptika. Dies führt zu einer verminderten Sensitivität dieser Zielstrukturen, was in mangelhaftem Therapieansprechen resultiert (REMY u. BECK 2006). Die *Multidrug*-Transporter-Hypothese führt den mangelhaften Therapieerfolg der

Patienten durch antikonvulsive Medikamente auf die Überexpression von *Multidrug*-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke zurück. Dadurch kann am Zielort, dem Nervenparenchym des ZNS, keine ausreichende Wirkstoffkonzentration erreicht werden (POTSCHKA 2010b). Zudem weisen Studien darauf hin, dass Inflammationsgeschehen im ZNS eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Epileptogenese, sowie dem mangelhaften Ansprechen einiger Patienten auf die Therapie mit Antiepileptika, spielen (VEZZANI et al. 2011b). Im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens wurde ein elektrisches *Status epilepticus*-Modell angewendet, welches bei Ratten zum Auftreten spontaner epileptischer Anfälle führt. Durch eine Behandlung mit dem Antiepileptikum Phenobarbital konnten die epileptischen Tiere daraufhin in zwei Gruppen eingeteilt werden. Therapierefraktäre Tiere wurden als *Nonresponder* und therapiesensitive Tiere als *Responder* klassifiziert. Anschließend wurden bei Kontrolltieren, *Respondern* und *Nonrespondern* Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Untersuchungen sowie immunhistologische Untersuchungen des Gehirngewebes durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen im Nagernmodell folgende Fragestellungen klären:

- Kann mit Hilfe des *Tracers* [^{11}C]-Flumazenil im Rahmen einer PET-Untersuchung ein Unterschied zwischen *Responder*- und *Nonresponder*-Tieren festgestellt werden?
- Kann mit Hilfe des *Tracers* [^{11}C]-PK11195 im Rahmen einer PET-Untersuchung ein Unterschied zwischen *Responder*- und *Nonresponder*-Tieren nachgewiesen werden?
- Kann mithilfe einer PET-Untersuchung, bei welcher die *Tracer* [^{11}C] Flumazenil und [^{11}C]-PK11195 zum Einsatz kommen eine Pharmakoresistenz epileptischer Ratten diagnostiziert werden?
- Kann bei der immunhistochemischen Untersuchung des Gehirngewebes ein signifikanter Unterschied in der Expression des *Multidrug-Transporters* P-Glycoprotein zwischen *Responder*- und *Nonresponder*-Tieren festgestellt werden?

- Kann bei der immunhistochemischen Untersuchung des Gehirngewebes ein signifikanter Unterschied in der Expression der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors zwischen *Responder*- und *Nonresponder*- Tieren festgestellt werden?

4 Material und Methoden

4.1 *Post-Status epilepticus*-Modell

4.1.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen zur Pharmakoresistenz bei Epilepsie wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuches (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.2-10-11) durchgeführt. Als Versuchstiere wurden weibliche *Sprague Dawley* Ratten (Harlan Winkelmann, An Venray, Niederlande) mit einem Gewicht von 200-224g verwendet. Dies entspricht einem Alter von ca. 10 Wochen. Die Tiere wurden einzeln in Käfigen (Makrokolon Typ III, hoch) gehalten. Als Einstreu diente Weichholzgranulat (WH-Grade 5, Altromin, Lage). Zusätzlich erhielt jedes Tier zur Beschäftigung (*environmental enrichment*) vier *Nestlets* von je 5x5 cm Größe (*Nestlets* aus Baumwolle, EBECO, Castrop-Rauxel). Futter (R/M-Haltung, 10mm, Sniff, Soest) und Leitungswasser standen ad libitum zur Verfügung. Einmal wöchentlich wurden die Tiere in frische Käfige umgesetzt. Dabei wurden sowohl Trinkwasser als auch *Nestlets* erneuert. Das Umsetzen erfolgte stets ein bis zwei Tage vor den Versuchen, um eine Beunruhigung der Tiere unmittelbar vor der Durchführung der Experimente zu vermeiden. Die Haltung der Tiere erfolgte mit einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus, wobei die Helligkeitsphase um 7.00 MEZ und die Dunkelphase um 19.00 MEZ begann. Die Luftfeuchtigkeit im Tierraum betrug 50-60%, die Umgebungstemperatur 20-24°C. Nach ihrer Ankunft konnten sich die Tiere vor Beginn der Versuchsdurchführung fünf Tage lang an die neuen Haltungsbedingungen gewöhnen. Um die Tiere mit dem Umgang durch die betreuenden Tierpfleger sowie Durchführer der Experimente vertraut zu machen, wurden sie mindestens eine Woche lang einem täglichen *Handling* unterzogen. Um zirkadiane Einflüsse der Tiere möglichst gering zu halten, wurde die Durchführung etwaiger Versuche zwischen 8.00 und 10.00 MEZ begonnen.

4.1.2 Elektrisches *Status epilepticus*-Modell

Implantation der Elektrode

Zunächst wurde den Tieren eine bipolare Ableitungs- und Stimulationselektrode aus rostfreiem Stahl mit einer Ummantelung aus Teflon in die rechte basolaterale Amygdala (BLA) implantiert.

Die Elektrode ist mit einem Steckeraufsatz verbunden, welcher im Versuchsverlauf sowohl für die Ableitung des Elektroenzephalogrammes (EEG), als auch für die elektrische Stimulation genutzt wird. Die Operation erfolgte unter Anästhesie mit 360 mg/kg Chloralhydrat (Merck KGaA, Darmstadt) gelöst in 10 ml/kg 0,9%iger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen), welches intraperitoneal appliziert wurde. Der Zwischenzehenreflex diente während der Anästhesie zur Überprüfung der Narkosetiefe. Damit eine perioperative Analgesie gewährleistet werden konnte, wurden die Tiere 30 Minuten vor, sowie 24 Stunden nach der Operation mit Meloxicam (1 mg/kg subkutan, Metacam®-Injektionslösung, Boehringer-Ingelheim) versorgt. Zudem erfolgte eine subkutane Injektion des Lokalanästhetikums Bupivacain (Jenapharm®, Mibe GmbH, Brehna) in das Operationsfeld. Des Weiteren wurde Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital, Leverkusen) lokal am Auge aufgetragen, um ein Austrocknen der Cornea zu verhindern.

Die exakte Positionierung der Elektrode in der BLA der rechten Gehirnhemisphäre erfolgte mithilfe eines stereotaktischen Apparates (TSE Systems GmbH, Bad Homburg). Der stereotaktische Atlas „The Rat Brain“ von Paxinos und Watson (2005) diente während der Operation zur Orientierung. Für die Implantation der Elektrode müssen Bregma, der rostrale Kreuzungspunkt der Knochennähte, und Lambda, der kaudale Kreuzungspunkt der Knochennähte, auf gleiche Höhe gebracht werden. Dies geschah durch Einstellung der Oberkieferhalterung auf -3,9 mm ventral der Interaurallinie. Vor Beginn der Operationen wurden Lokalisationsversuche durchgeführt, um die exakte Positionierung der Elektrode gewährleisten zu können.

Es wurden folgende Koordinaten in Relation zu Bregma verwendet: -2,2 mm anterior-posterior, -4,7 mm latero-lateral, -8,5 mm dorso-ventral. Um eine

dauerhafte Befestigung der Elektrode zu gewährleisten, wurden drei Fixationsschrauben in der Schädeldecke befestigt. An einer dieser Schrauben wurde die von Teflon ummantelte Erdungselektrode angebracht. Zur dauerhaften Befestigung der Elektrode wurde der kaltpolymerisierende Kunststoff Paladur® (Heraeus, Hanau) verwendet. Um einer Wundinfektion vorzubeugen, wurde die der Schädeldecke unmittelbar aufliegende Schicht Paladur mit 2,1% Gentamicinsulfat (Sigma-Aldrich, München) vermischt. Des Weiteren wurde den Tieren über einen Zeitraum von acht Tagen zweimal täglich 1 mg/kg Marbofloxacin (Marbocyl®, Vétoquinol, Ravensburg) subkutan appliziert, beginnend am Vortag der Operation. Es folgte eine Rekonvaleszenzphase von sechs Wochen.

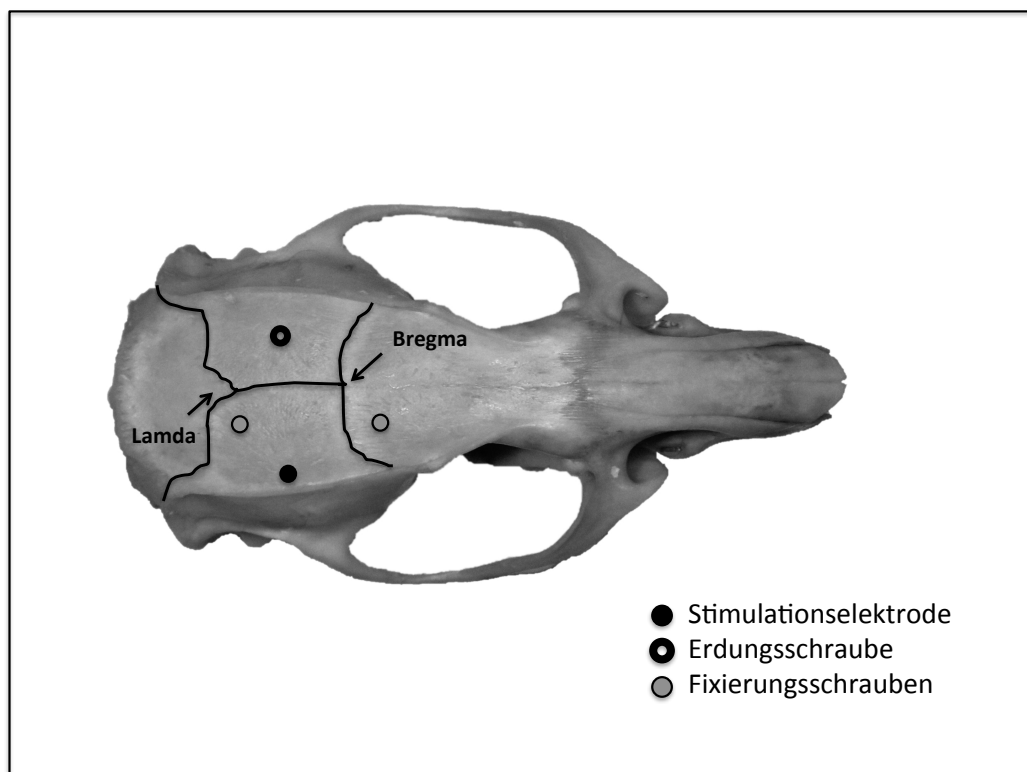


Abbildung 5: Aufsicht auf den Schädel einer Ratte mit den Lokalisationspunkten der Stimulationselektrode, der Erdungsschraube sowie der Fixierungsschrauben (Originalfoto von T. Licko)

SE-BLA-Modell

Zur Induktion eines sich selbst erhaltenden *Status epilepticus* (*self sustained status epilepticus*, SSSE) erfolgte mithilfe der zuvor implantierten Elektrode eine elektrische Stimulation der BLA. Daraufhin kommt es nach einer Latenzzeit von vier bis sechs Wochen zum Auftreten spontaner epileptischer Anfälle. Um individuelle Abweichungen von der Norm zu erfassen, wurde zunächst ein Basal-Elektroenzephalogramm (EEG) aufgezeichnet. Dabei wurden die Tiere mithilfe des Steckeraufsatzes über ein dreiaderiges Kabel mit der Aufzeichnungseinheit verbunden. Für die darauf folgende Elektrostimulation wurden die Tiere über ein zweiaderiges Kabel an die Stimulationseinheit (Accupulser Modell A31C und Stimulus Isolator A365, World Precision Instruments, Berlin) angeschlossen. Die Stimulation erfolgte durch einen Reizstrom aus bipolaren, jeweils eine Sekunde andauernden Einzelimpulsen. Die Stromstärke betrug 700 μ A, die Frequenz 50 Hz. Nach 25 Minuten wurde die elektrische Stimulation beendet. Durch die sich anschließende erneute Ableitung eines EEGs wurde überprüft, ob sich die Tiere im *Status epilepticus* (SE) befanden. Dabei treten während des SE charakteristische Ausschläge auf, die im Vergleich zum Basal-EEG mindestens die doppelte Amplitudenhöhe besitzen. Während der gesamten Dauer der Stimulation, sowie innerhalb der darauffolgenden 215 Minuten, in denen sich die Ratten im SSSE befanden, erfolgte eine kontinuierliche Überwachung der Tiere. Dabei wurde das Auftreten, sowie die Schwere der Anfälle dokumentiert, so dass anschließend eine Einteilung der Tiere in verschiedene Typen des SSSE nach Brandt et al. (2003) erfolgen konnte (siehe Kap.4.1.3). Der Typ I SSSE (fokaler SSSE) zeichnet sich dabei durch konstante fokale Anfallsaktivität aus, im Gegensatz zum Typ III SSSE (generalisierter SSSE), welcher sich in konstanten generalisierten Anfällen äußert. Bei Typ II SSSE wird ein fokales Anfallsgeschehen hin und wieder von generalisierten Anfällen unterbrochen. Nach insgesamt 240 Minuten wurde der SE durch die intraperitoneale Verabreichung von Diazepam (Diazepam-Ratiopharm®-Injektionslösung, Ratiopharm GmbH, Ulm 10mg/kg) unterbrochen. Danach wurde erneut ein EEG abgeleitet, um jegliche weitere Krampfaktivität auszuschließen. Falls eine andauernde Krampfaktivität nicht

ausgeschlossen werden konnte, wurde die Applikation von Diazepam in gleicher Dosierung solange wiederholt, bis im EEG keine Krampfaktivität mehr messbar war. Die Stimulationsdauer von 25 Minuten, sowie die Aufrechterhaltung des SSSE für vier Stunden wurden als Parameter in Anlehnung an Publikationen anderer Arbeitsgruppen (BRANDT et al. 2003) ausgewählt. Im Anschluss an die Elektrostimulation traten bei den stimulierten Tieren nach einer Latenzphase von vier bis sechs Wochen spontane epileptische Anfälle auf. Anschließend an die Elektrostimulation wurde den Tieren zur Unterstützung der Regeneration einmalig Ringer-Lactat-Lösung (DeltaSelect GmbH, Dreieich, 3 ml/Tier i.p. sowie 10 ml/Tier s.c.) injiziert. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurden die Tiere in der Aufwachphase mithilfe eines Heizkissens gewärmt. Tiere, die durch den SSSE stark geschwächt waren, wurden solange mit Babybrei gefüttert, bis sie selbständig Nahrung aufnehmen konnten. Die Kontrolltiere wurden analog den stimulierten Tieren für vier Stunden in Glas-Terrarien verbracht und bekamen im Anschluss daran ebenfalls Diazepam appliziert.

4.1.3 Anfallsparameter

Die Einordnung der Krampfaktivität in verschiedene Anfallsstadien erfolgte anhand der durch BARAN (1995) modifizierte Einteilung von RACINE et al. (1975). Die Klassifizierung beruht auf der Dauer und dem Schweregrad der epileptischen Anfälle, die bei der Elektrostimulation auftreten. Abhängig von der während der Stimulation auftretenden Anfallsschwere konnten bei den Tieren unterschiedliche Typen eines SSSE beobachtet werden. Der fokale SSSE (Typ I) zeichnet sich durch konstante fokale Anfallsaktivität aus. Beim generalisierten SSSE (Typ III) treten konstant generalisierte Anfälle auf. Der Typ II SSSE ist gekennzeichnet durch fokales Anfallsgeschehen, welches hin und wieder von generalisierten Anfällen unterbrochen wird.

Stadium der Anfallsschwere	Typ SSSE		Anfallscharakteristika	
I	I		Fokale Anfallsaktivität	Immobilität, schwacher Fazialklonus (Schließen eines oder beider Augen, Zittern der Tasthaare, stereotypes Schnüffeln)
II				Schwere Fazialklonien (klonische Kaubewegungen und Kopfnicken)
III				Unilateraler Vorderextremitätenklonus
IV	III	II	Generalisierte Anfallsaktivität	Bilateraler Vorderextremitätenklonus mit Aufrichten des Rumpfes
V				Bilateraler Vorderextremitätenklonus mit Verlust der Stellreflexe
VI (<i>Running and Bouncing</i>)				Stadium V mit explosionsartigem Rennen und Springen

Tabelle 1: Skala der Krampfstadien (nach BARAN et al. 1995)

4.1.4 Überwachung spontaner Anfälle in der Vehikelpphase

Acht Wochen nach der Stimulation begann die zweiwöchige EEG- und Videoüberwachung zur Detektion spontan auftretender epileptischer Anfälle. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in Glas-Terrarien gesetzt, welche mithilfe von Kameras überwacht wurden. Jedes Tier befand sich in einem von drei Seiten verglasten Terrarium von 40 cm Länge, 35 cm Breite und 35 cm Höhe. Zudem waren die Ratten mit einem dreiaderigen, abgeschirmten, ummantelten Kabel über den Steckeraufsatz mit einer EEG-Aufzeichnungseinheit verbunden. Die EEG-Überwachung diente zur Ermittlung des genauen Zeitpunktes und der Dauer der Anfälle. Die Klassifizierung der Anfallstypen erfolgte anschließend anhand der Videoaufzeichnungen. Zunächst erfolgte eine 14tägige Vehikelpphase, in welcher den Tieren zweimal täglich NaCl-Lösung (0,9%ig, 3 ml/kg i.p.) appliziert

wurde. Die Kontrolltiere wurden analog den epileptischen Tieren ebenfalls in Glas-Terrarien verbracht.

Aufzeichnung des Elektroenzephalogramms

Jedes der 20 überwachten epileptischen Tiere wurde über den Steckeraufsatz mit der Aufzeichnungseinheit verbunden. Zu diesem Zweck wurden dreiaderige, abgeschirmte, ummantelte Kabel aus eigener Anfertigung verwendet, die mit einem Telefonverdrehler verbunden waren. Die Aufzeichnungseinheit setzte sich zusammen aus je einem Ein-Kanal-Verstärker (*BioAmps*, ADInstruments Ltd., Hastings, UK) pro Tier, insgesamt 3 Analog Digitalwandlern (*PowerLab/800s*, ADInstruments Ltd., Hastings, UK) und einem PC. Zur Analyse der Daten wurde die Software Chart 7 für Windows (ADInstruments Ltd., Spechbach) verwendet. Die Abtastrate bei der Aufzeichnung betrug 200 Hz. Frequenzen unter 0,1 Hz wurden von einem *high pass filter* eliminiert, Frequenzen über 60 Hz von einem *low pass filter*. Ein *Notch*-Filter wurde zur Filterung der Frequenz des Netzstroms (50 Hz Frequenzbereich) eingesetzt.

Video-Aufzeichnung

Für die Aufzeichnung der Videos wurden drei Schwarz-Weiß-CCD-Kameras (Conrad Electronic GmbH, Hannover) sowie eine Farbkamera (Conrad Electronic GmbH, Hannover) eingesetzt. Um auch bei Nacht optimale Aufnahmen zu gewährleisten, enthielten alle Kameras interne Infrarot-Strahler und einen Lichtsensor. Dadurch erfolgte automatisch eine Anpassung an die externen Lichtverhältnisse. Pro Kamera konnten fünf Tiere aufgezeichnet werden. So wurden insgesamt 20 Tiere gleichzeitig überwacht. Die Daten wurden auf einer RAID (*redundant array of independent discs*) gespeichert. Diese RAID stellt ein Festplattensystem mit erhöhter Leistungsfähigkeit und Ausfallsicherheit dar. Die Auswertung der Videodaten erfolgte mithilfe der Software Digi-Protect-Searcher (ABUS Group Security-Center, Affing/Mühlhausen).

4.1.5 Selektion der *Responder* und *Nonresponder*

Auf die Vehikelfase folgte eine 14-tägige Selektionsphase, in der ebenfalls spontan auftretende epileptische Anfälle erfasst wurden. Sowohl die EEG-, als auch die Videoaufzeichnungen wurden entsprechend der Vehikelfase fortgeführt. Zur Selektion von pharmakosensitiven Tieren (*Responder*) und pharmakoresistenten Tieren (*Nonrespondern*) wurde Phenobarbital (PB) (Phenobarbital sodium salt, Sigma-Aldrich, München) anstelle von NaCl-Lösung appliziert. Die Tiere erhielten zweimal täglich eine PB-Injektion (15 mg/kg i.p.). Lediglich am ersten Tag der Selektionsphase wurde morgens ein Bolus von 25 mg/kg verabreicht. Kontrolltiere erhielten die gleiche Medikation. Tiere, die in der PB-Phase eine Anfallsreduktion um 100% zeigten, wurden anschließend als *Responder* bezeichnet. Konnte keine vollständige Anfallsfreiheit erreicht werden, wurden die Tiere der Gruppe der *Nonresponder* zugeordnet.

4.1.6 Überprüfung der Phenobarbital-Plasmakonzentration

Zur Überprüfung des PB-Plasmaspiegels wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten Blutentnahmen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die laterale Schwanzvene der Tiere unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Isofluran CP®, cp-Pharma®, Burgdorf) mit einer Introcan®-Venovenverweilkanüle (24G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) punktiert. Dadurch konnte jedem Tier ca. 500 µl Blut entnommen werden. Falls eine Blutentnahme aus der Vena caudalis lateralis im Einzelfall nicht möglich war, wurde eine retroorbitale Blutentnahme nach zusätzlicher lokaler Betäubung mit Tetracainhydrochlorid (Ophtocain N, Dr. Winzer Pharma GmbH, Berlin) durchgeführt. Die Blutentnahmen fanden an Tag 13 der Vehikelfase sowie an Tag 5 und 12 der PB-Phase statt. Für die Erfassung der PB-Konzentration im Plasma wurden die Blutproben mit EDTA (EDTA-Dinatriumsalz, AppliChem GmbH, Darmstadt) versetzt, anschließend zentrifugiert und die Konzentration im Plasma mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High performance liquid chromatography*, HPLC) (Eurospher 100-5 C18, Knauer, Berlin) mit Ultraviolett-Detektor (Smartline 2600, Knauer,

Berlin) gemessen.

4.2 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

4.2.1 PET-Scanner und Radiopharmaka

Die PET-Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Stina Syvänen und Marten Schenke der holländischen Forschergruppe *Division of Pharmacology Leiden / Amsterdam Center for Drug Research* im *Department of Nuclear Medicine & PET Research, VU University Medical Center*, Amsterdam, Niederlande. Die Versuche liefen unter dem Aktenzeichen UDEC09223 des *Ethics Committee for Animal Experiments of Leiden University*. Insgesamt erfolgten die Untersuchungen an 22 Tieren, wovon zwei Tiere im Nachhinein ausgeschlossen wurden, da sie während der gesamten Überwachungsphase keine spontanen epileptischen Anfälle gezeigt hatten (Kontrolltiere n=8, *Responder* n=5, *Nonresponder* n=7, unklassifizierbar n=2). Bei zwei Tieren (Kontrolltier n=1, *Nonresponder* n=1) konnte aufgrund der schwierigen Synthese des *Tracers* [^{11}C]PK11195 dieser *Scan* nicht durchgeführt werden.

Es wurde ein *High Resolution Research Tomograph* (HRRT, Siemens/CTI, Knoxville, TN, USA) PET Scanner verwendet. Zur Korrektur von Abschwächung und Streuung der emittierten Strahlung wurde vor Beginn der Emissionsscans mit Hilfe einer beweglichen, zweidimensionalen Punktquelle (^{137}Cs , 740MBq, Fächerkollimator, 662keV) (VAN VELDEN et al. 2009) ein zehnminütiger Transmissionsscan durchgeführt. Die verwendeten Radiopharmaka (*Tracer*) [^{11}C]Flumazenil, [^{11}C]PK11195 und [^{18}F]Fluorodeoxyglucose wurden unmittelbar vor der Anwendung vor Ort hergestellt und jeweils 30 Sekunden nach Beginn der Emissionsscans injiziert.

[^{11}C]Flumazenil

[^{11}C]Flumazenil wurde wie zuvor von MAZIERE et al. (1984) beschrieben synthetisiert. 3-10 GBq wurden in 10 ml Saline angesetzt, welche 7,1 mM NaH_2PO_4 und 10%igen Ethanol enthielt. Die spezifische Aktivität betrug 178 ± 69 GBq/ μmol (Mittelwert \pm Standardabweichung). Durch HPLC mit Radio-

und UV-Detektoren wurde eine radiochemische Reinheit von über 99 Prozent ermittelt. Es konnten keine chemischen Verunreinigungen detektiert werden. Durch Vergleich mit der Retentionszeit von isotopisch unmodifiziertem, d.h. radiochemisch unmarkiertem Flumazenil, wurde die Identität von [^{11}C]Flumazenil bestätigt.

[^{11}C]PK11195

[^{11}C]PK11195 wurde wie zuvor von SHAH et al. (1994) beschrieben hergestellt. Dabei entstand eine sterile, pyrogenfreie Flüssigkeit in phosphatgepufferter Saline (pH 5,4 - 6,0) mit einer radiochemischen Reinheit von über 98 Prozent und einer spezifischen Aktivität von $100 \pm 36 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$.

4.2.2 Ablauf der PET-Untersuchungen

Vorbereitung der Tiere

Die PET-Untersuchungen fanden nach einer Eingewöhnungszeit von 4 Wochen nach Ankunft der Tiere in Amsterdam statt. Ein bis zwei Stunden vor Beginn der PET Untersuchungen wurden die Ratten mit 60 mg/kg Ketamin (Ketanest-S® Pfizer, Capelle a/d IJssel, Netherlands) sowie 0,4 mg/kg Medetomidin (Domitor® Pfizer Capelle a/d IJssel, Netherlands) intraperitoneal anästhesiert. In die linke Femoralvene wurde zur Injektion der Radiopharmaka ein Polyethylenschlauch von 96 mm Durchmesser eingeführt, in die linke Femoralarterie wurde zur Blutentnahme ein Polyethylenschlauch von 62 mm Durchmesser eingeführt. Beide Katheter wurden bereits zuvor mit physiologischer Kochsalzlösung, welche mit 25 IU/ml Heparin (Pharmacy, Leiden University Medical Centre, Leiden, Niederlande) versetzt war, gefüllt.

Diese Katheter wurden speziell hierfür folgendermaßen angefertigt: Während ein Metalldraht in den Polyethylenschlauch eingeführt wird um das Lumen zu erhalten, wird der Schlauch erhitzt und gestaucht. Auf diese Weise bildet sich eine kleine Wölbung nach außen, welche eine bessere Fixierung im Gefäß

ermöglicht. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde ca. 60 bis 120 Minuten nach Narkoseeinleitung ein Gemisch aus Ketamin (10 mg/kg pro Stunde) und Medetomidin (0,1 mg/kg pro Stunde) in die Schwanzvene infundiert. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde der Zwischenzehenreflex angewendet. War dieser während der Infusion positiv, wurde die Infusionsrate um 30% gesteigert bis der Reflex negativ ausfiel.

PET-Scans

Die PET-Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit der holländischen Forschergruppe *Division of Pharmacology Leiden / Amsterdam Center for Drug Research* im *Department of Nuclear Medicine & PET Research, VU University Medical Center, Amsterdam, Niederlande*.

Es wurden jeweils zwei narkotisierte Ratten gleichzeitig im PET-Scanner in Bauchlage platziert und untersucht. Die Fixierung des Kopfes wurde durch eine spezielle Halterung gewährleistet. Durch Wärmekissen wurde die Körpertemperatur von 36-38°C aufrecht erhalten. Während der gesamten Dauer der Untersuchungen wurden die Sauerstoffsättigung im Blut und die Pulsfrequenz überwacht. Zunächst wurde mit Hilfe einer beweglichen zweidimensionalen Punktquelle (^{137}Cs , 740 MBq, Fächerkollimator, 662 keV; Van Velden FH, 2009) ein zehnminütiger Transmissionsscan zur späteren Korrektur von Abschwächung und Streuung der emittierten Strahlung durch unterschiedliche Gewebedichten durchgeführt. Anschließend wurde den Tieren $15,3 \pm 1,3$ MBq (Mittelwert \pm SEM) [^{11}C]Flumazenil in die linke Femoralvene appliziert, woraufhin ein dynamischer Emissionsscan von 30 Minuten Dauer erfolgte. Ein weiterer 30minütiger Emissionsscan erfolgte nach intravenöser Verabreichung von 15 mg/kg des Pgp-Inhibitors Tariquidar (API Services Inc, Westford, MA, USA). Um für die spätere Kalkulation der Pharmakokinetik des Tracers unterschiedliche Besetzungsdichten des GABA_A-Rezeptors zu erreichen, wurden dem radioaktiv markierten [^{11}C]Flumazenil unterschiedliche Dosen kalten, d.h. unmarkierten Flumazenils beigefügt. Die Dosis betrug bei 4 Ratten

4 µg, bei 8 Ratten 20 µg, bei 8 Ratten 100 µg und bei 3 Ratten 500 µg. Die Zuordnung der jeweiligen Dosierungen zu den Ratten erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Da jede Ratte im zweiten *Scan* den selben Anteil an unmarkiertem Flumazenil erhielt wie im ersten *Scan*, diente jeder Ratte der erste *Scan* jeweils als individuelle Kontrolle zum zweiten *Scan*. Des Weiteren wurde von jeder Ratte ein 60minütiger Emissionsscan durchlaufen, der auf eine intravenöse Injektion von $13,3 \pm 1,9$ MBq (Mittelwert \pm SEM) [^{11}C]PK11195 folgte. Es schloss sich ein letzter, 60minütiger *Scan* nach Injektion von $11,0 \pm 1,32$ MBq (Mittelwert \pm SEM) [^{18}F]Fluorodeoxyglucose (^{18}FDG) an. Die Emissionsscans wurden jeweils 30 Sekunden vor Injektion der *Tracer* gestartet.

Blutentnahmen zur Überprüfung der Plasmakonzentration von [^{11}C]Flumazenil und [^{11}C]PK11195

Während der beiden [^{11}C]Flumazenil-Scans vor und nach Applikation von Tariquidar wurde jeweils zu sechs Zeitpunkten 0,1 ml Blut aus der Femoralarterie entnommen. Für die beiden [^{11}C]Flumazenil-Scans wurde folgendes Schema angewendet. Bei der Hälfte der Ratten wurde bei dem ersten [^{11}C]Flumazenil-*Scan* zu den Zeitpunkten 0,5 min, 1 min, 2 min, 3 min, 12 min, und 30 min Blut entnommen, bei dem zweiten [^{11}C]Flumazenil-*Scan* zu den Zeitpunkten 0,5 min, 1 min, 3 min, 5 min, 15 min und 30 min. Bei der anderen Hälfte der Ratten erfolgten die Blutentnahmen bei dem ersten [^{11}C]Flumazenil-*Scan* zu den Zeitpunkten 0,5 min, 1 min, 3 min, 5 min, 15 min und 30 min, bei dem zweiten [^{11}C]Flumazenil-*Scan* zu den Zeitpunkten 0,5 min, 1 min, 2 min, 3 min, 12 min, und 30 min. Diese Variation in den Zeitpunkten diente für die spätere Anwendung eines Modells zur Kalkulation der Pharmakokinetik von [^{11}C]Flumazenil. Um die Esterase-Aktivität zu inhibieren, wurden die Blutproben unmittelbar nach Entnahme in 0,5 ml 0,42%iger NaF-Lösung (Pharmacy, Leiden University Medical Centre, Leiden, Niederlande) in Wasser verdünnt und bei -80°C bis zu weiteren Untersuchungen gelagert. Während des [^{11}C]PK11195-Scans wurden ebenfalls sechs Blutproben von 0,1 ml entnommen. Dies geschah bei allen Tieren zu den Zeitpunkten 20 sec, 40 sec, 1 min, 5 min, 20 min und

Injizierte Radioaktivität pro Körpergewicht

60 min. Durch Zentrifugation der Blutproben bei 5000 rpm für 5 min in einem heparinisierten Eppendorf-Cup wurde Plasma gewonnen. Ein Tropfen Vollblut wurde jedoch zurückbehalten, um die Radioaktivität in Blut und Plasma für den Verlauf der PET-Untersuchungen bestimmen zu können. Die Aktivität in Vollblut sowie Plasma wurde in einem automatischen, gegen den PET-Scanner kreuzkalibrierten Gamma Counter (1282 Compugamma CS, Universal Gamma Counter, LKB Wallac, Turku, Finnland) gemessen.

4.2.3 Rekonstruktion und Analyse der PET-Daten

Die PET-Daten wurden im 3D Modus in folgenden Bildsequenzen aufgenommen: 6x10 s, 2x30 s, 3x60 s, 2x150 s, 2x300 s und 1x600 s. Nach einer Korrektur auf Abschwächung, Streuung und Zufallsereignisse der emittierten Strahlung wurden die PET-Bilder mit Hilfe der iterativen 3D-OSWLS Methode (*ordered subsets weighted least squares method*) (VAN VELDEN et al. 2009), rekonstruiert. Die Bildanalyse erfolgte mit Hilfe der Software Amide 0.8.22 (LOENING u. GAMBHIR 2003). Durch Überlagerung eines Summationsbildes des ¹⁸FDG-Scans mit einem MRT-basierten Atlas des Rattengehirns, konnten die zu untersuchenden Bereiche (*regions of interest*, ROIs) festgelegt werden. Die fünf ROIs Hippocampus, okzipitaler Cortex, parietaler Cortex, *Putamen caudate* und Cerebellum wurden anschließend auf jedes Zeitfenster jeden Scans projiziert, woraus sich für jede Ratte für jeden Scan eine Zeit-Aktivitäts-Kurve ergab. Diese wurden auf die individuell injizierte Aktivität und das Körpergewicht korrigiert, um einen Vergleich der Tiere untereinander zu ermöglichen. So ergaben sich die SUV-Werte (*standardized uptake value*), welche ein Maß für die Anreicherung (>1) bzw. Abreicherung (< 1) des Radiopharmakons darstellen.

4.3 Histologie

4.3.1 Histologische Gewebeaufbereitung

Unmittelbar nach Abschluss der PET-Untersuchungen wurden die noch narkotisierten Tiere dekapitiert. Anschließend wurde das Gehirn vorsichtig aus dem knöchernen Schädel gelöst und die beiden Gehirnhemisphären voneinander getrennt. Die gesamte rechte Gehirnhemisphäre wurde unmittelbar nach Entnahme mit Hilfe von flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zu diesem Zweck wurde das Gewebe in einem Aluzylinder vollständig in Gefriermedium (Jung Tissue freezing Medium®, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch) eingebettet und anschließend in Methylbutan (2-Methylbutan reinst, AppliChem GmbH, Darmstadt) verbracht, welches in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Bis zur weiteren Probenaufbereitung wurde das Gewebe bei -80°C gelagert.

Zur Anfertigung der coronalen Schnitte der rechten Gehirnhemisphäre wurde diese in einen Kryostaten (2800 Frigocut N, Reichert Jung, Wetzlar) verbracht, aufgefroren und unter Zuhilfenahme eines Skalpells das umgebende Einbettmedium entfernt. Bei einer Messertemperatur von -17°C und einer Objekttemperatur von -18°C wurden mithilfe des Kryostaten 20 µm dicke Schnitte angefertigt und sofort auf HistoBond®-Adhäsionsobjektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen) verbracht. In den Bregmaregionen -2,3 sowie -3,8 und -5,8 wurden jeweils 14 µm dicke Schnitte angefertigt, welche zur Färbung von P-Glycoprotein herangezogen wurden. Die Schnitte wurden im Kryostaten bei -20°C zwischengelagert und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

4.3.2 Histologische und immunhistochemische Färbemethoden

Zur Darstellung anfallsinduzierter Veränderungen auf zellulärer Ebene wurden mithilfe von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern verschiedene Färbungen durchgeführt. Monoklonale Antikörper richten sich nur gegen ein Epitop eines Proteins, da sie aus einer einzelnen B-Zelllinie stammen. Sie besitzen daher eine höhere Spezifität als polyklonale Antikörper, was eine differenziertere

Betrachtung einzelner Proteine erlaubt. Polyklonale Antikörper hingegen stammen aus verschiedenen B-Lymphozyten. Dadurch richten sie sich gegen dasselbe Protein, jedoch gegen unterschiedliche Epitope dieses Proteins. Bei Zerstörung oder Maskierung eines Epitopes besitzen polyklonale Antikörper den Vorteil, dass sie über andere Epitope noch immer an das gesuchte Protein binden können.

Mithilfe einer *Cover-Plates*-Apparatur wurden Pgp und die γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors immunhistochemisch angefärbt. Des Weiteren erfolgte eine Nissl-Färbung zur Beurteilung der Neurodegeneration.

Nissl-Färbung

Pro Tier wurden zehn Schnitte von 20 μm Dicke mit der Nissl-Methode gefärbt. Der hierfür verwendete Farbstoff Thionin färbt selektiv Stapel des endoplasmatischen Retikulums (Nissl-Schollen) an, was ihn besonders geeignet für die Darstellung der Somata von Neuronen macht. Da Gliazellen im Vergleich zu Nervenzellen keine Nissl-Schollen aufweisen, kann deutlich zwischen den beiden Zelltypen differenziert werden.

Immunhistochemische Färbungen

Für die Darstellung des Pgp und der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors kam das folgende Protokoll zur Anwendung. Um die methodische Varianz so gering wie möglich zu halten, wurden die Färbungen jeweils bei den zu vergleichenden Gruppen an allen Gehirnschnitten gleichzeitig durchgeführt.

Auf eine sechsstündige Trocknung der Schnitte bei Raumtemperatur folgte eine achtminütige Fixierung in frischem Aceton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Über Nacht wurden die Schnitte erneut bei Raumtemperatur getrocknet. Zunächst wurden die Schnitte in Tris-gepufferter Natriumchloridlösung (TBS, pH 7,6) gründlich gewaschen. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten in 0,5%iger Wasserstoffperoxidlösung (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe). Nach erneutem Waschen mit TBS

wurden die Objektträger in eine *Cover-Plates*-Apparatur (Shandon Sequenza, Thermo Electron Corporation, Dreieich) eingespannt und anschließend 60 Minuten mit *Blockinglösung* inkubiert, um unspezifischen Reaktionen des primären Antikörpers vorzubeugen. Unmittelbar darauf folgte die Behandlung mit dem primären Antikörper in einer *Carrier-Lösung*. Die Inkubationszeit betrug 12-16 Stunden bei 4°C. Die Schnitte wurden nach erneuten Waschungen mit TBS mit einem Biotin-gekoppelten sekundären Antikörper versetzt und 90 Minuten lang inkubiert. Es folgten erneute Spülungen mit TBS, um noch ungebundenen sekundären Antikörper zu eliminieren. Daraufhin wurden die Schnitte mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex (Streptavidin-HRP, 1:1400 in TBS, Biozol, Eching) behandelt. Nach einer erneuten 60minütigen Inkubationszeit wurde überschüssiges Streptavidin-HRP durch Waschen mit TBS entfernt. Zur Sichtbarmachung der Antigenbindung wurde eine Nickel-verstärkte 3,3 Diaminobenzidin-Reaktion (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom) genutzt. Nach fünf Minuten wurde die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen zuerst mit TBS und anschließend mit destilliertem Wasser beendet. Über Nacht wurden die Schnitte getrocknet, anschließend dehydriert und mit Entellan (Fa. Merck, Darmstadt) eingedeckt. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper-Systeme gibt Tabelle 2.

Primärer Antikörper	C-219 Maus-anti-Pgp	Rabbit anti-GABA_A-Receptor γ_2
Hersteller	Calbiochem, Bad Soden	NovusBiologicals, Cambridge
Klonalität	monoklonal	polyklonal
Konzentration	1:50	1:300
Sekundärer Antikörper	Biotinylierter Esel-anti-Maus-Antikörper	Biotinylierter Esel-anti-Kaninchen-Antikörper
Hersteller	Jackson ImmunoResearch, USA	Jackson ImmunoResearch, USA
Konzentration	1:200	1:500
Carrier-Lösung	TBS 1% Esel-Serum 1% BSA 3% Triton X-100	
Blocking-Lösung	TBS 11% Esel-Serum, 3% BSA, 3% Triton X-100	

Tabelle 2: Übersicht über die für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendeten Antikörper-Systeme

4.3.3 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen von P-Glycoprotein (Pgp) und der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors erfolgte verblindet. Zur Messung der optischen Dichte (OD) wurde ein computergestütztes Bildanalysesystem verwendet, bestehend aus einem Olympus BH2-Mikroskop mit einer Plan-Neofluar Linse (Zeiss, Göttingen) und einer CCD (*single chip charge couple device*)-Farbkamera (AxioCam MRc Zeiss, Göttingen) sowie einem Computer mit

AMD Athlon™ 64 Prozessor, ausgestattet mit einer bildgebenden *Interfacekarte* (Axiocam MR Interface Rev.A, Zeiss, Göttingen). Die Analyse erfolgte bei einer Auflösung von 1300x1030 Pixeln mit 400facher Vergrößerung. Um einen Einfluss der Betriebstemperatur auf das Signal-Rausch-Verhältnis auszuschließen, wurden die Geräte jeweils eine Stunde vor Beginn der Messungen in Betrieb genommen. Des Weiteren erfolgte eine Kalibrierung des Systems mithilfe eines OD-Standards (Calibration of Step Tablet No. 507ST101, Eastman Kodak Company, USA). So konnte die Beleuchtungsstärke des Mikroskops überprüft und konstant gehalten werden. Um Differenzen in der Helligkeit auszugleichen, wurde eine *Shading correction*, d.h. Korrektur optischer Distorsion durchgeführt. Dies geschah indem ein freier Bereich eines Objektträgers gemessen und der entsprechende Wert von allen gemessenen Objekten abgezogen wurde. Um deutlich zwischen Pgp-Signal und Hintergrund unterscheiden zu können, wurde ein Schwellenwert, der sogenannte *Threshold* bestimmt. Zu diesem Zweck wurde zunächst in jedem Schnitt bei jeder Region der *Threshold* gemessen. Der Wert, der bei der anschließenden Messung verwendet wurde, ergab sich aus dem Mittelwert aller Schnitte dieser Region. Da der Bereich unterhalb des Schwellenwertes als Hintergrund definiert wurde, wurden in die Auswertung nur deutlich oberhalb des Schwellenwertes liegende Signale mit einbezogen. Solange das Hintergrundsignal nicht stärker als $\pm 3\%$ variiert, zeigen Bildanalysesysteme mit fester Schwelle vergleichbare Objektivität (RIEUX et al. 2002), weshalb alle Schnitte einer Messreihe gleich behandelt wurden. Um auf einen Wert für die OD zu kommen, welcher auf den Hintergrund korrigiert ist, wurde die mittlere OD des Hintergrundsignals von der mittleren OD des Pgp- bzw. γ_2 -positiven Signals abgezogen. Zur Quantifizierung des Pgp wurden in Relation zu Bregma in den Ebenen -2,3mm, -3,8mm und -5,8mm folgende Regionen analysiert: Parietaler Cortex, piriformer Cortex, hippocampaler Hilus, *Gyrus dentatus* (GD, hippocampale Körnerzellschicht) und Ammonshorn (*Cornu Ammonis*, CA₁- und CA₃-Region). Die Quantifizierung der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors erfolgte in den Ebenen -2,4; -4,0 und -5,7 in Relation zu Bregma im Bereich des *Gyrus dentatus*, des Hilus des *Gyrus dentatus* sowie in der CA₁- und CA₃-Region des Hippocampus.

Scoring-System zur Quantifizierung der Neurodegeneration

In thioningefärbten Schitten wurden die CA₁-, CA₂-, CA₃- und CA₄- Region sowie der piriforme und parietale Cortex jeweils zur Erfassung der Neurodegeneration im Hippocampus untersucht. Zu diesem Zweck wurde folgendes *Scoring-System* angewendet: keine offensichtlichen Läsionen (0), schwaches Auftreten von Läsionen, d.h. Zellverluste von weniger als 20% der Neuronen (1), Läsionen mit Einbezug von 20-50% der Neuronen (2), Läsionen mit Einbezug von mehr als 50% der Neuronen (3) (BRANDT et al. 2006). Es ist zu berücksichtigen dass Neurodegeneration erst ab 15-20% neuronaler Zellverluste zuverlässig mittels visueller Inspektion festgestellt werden kann (FUJIKAWA et al. 2000).



Abbildung 6: Nissl-Färbung. Dargestellt ist ein Ausschnitt des rechten Hippocampus einer Ratte im Coronalschnitt. Der *Gyrus dentatus* (GD) sowie die CA₁- und CA₃-Region des Hippocampus sind deutlich zu erkennen. CA = *Cornu ammonis*

Statistik

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 5 für Windows. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler (mean \pm Standard Error of the Mean). Das Signifikanzniveau wurde festgelegt auf $p < 0,05$. Zunächst wurden die Daten mit dem Test nach Kolmogorov-Smirnoff auf Gauß'sche Normalverteilung getestet. Der ungepaarte t-Test wurde bei

Vorliegen parametrischer Daten angewendet, der Mann-Whitney U-Test bei Vorliegen nicht parametrischer Daten. Für den Vergleich von zwei Stichproben wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) angewendet, die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse kam bei nicht parametrischen Daten zum Einsatz. Grundsätzlich wurde zweiseitig getestet, einseitig lediglich wenn aufgrund bekannter Literatur eine Veränderung der Daten in nur eine Richtung zu erwarten war.

4.4 Versuchsdesign

Bei 41 Ratten wurde nach Implantation einer Stimulationselektrode eine elektrische Dauerstimulation zur Auslösung eines SSSE durchgeführt. Nach einem Zeitraum von acht Wochen wurden 20 epileptische Tiere mittels Video- und EEG-Aufzeichnungen für den Zeitraum von vier Wochen überwacht. Während der ersten 14 Tage des Überwachungszeitraumes erhielten die Tiere 0,9%ige NaCl-Lösung (2x tägl. 3 ml/kg i.p.). Diese Vehikelpphase diente der Erfassung spontan auftretender Anfälle. Anschließend folgte eine 14tägige Behandlung mit Phenobarbital (2x tägl. 15 mg/kg i.p.), welche zur Selektion pharmakosensitiver (*Responder*) und pharmakoresistenter (*Nonresponder*) Tiere diente. Während der gesamten Überwachungsphase wurde 15 Kontrolltieren, welche keine Elektrostimulation durchlaufen hatten, die gleiche Behandlung zuteil.

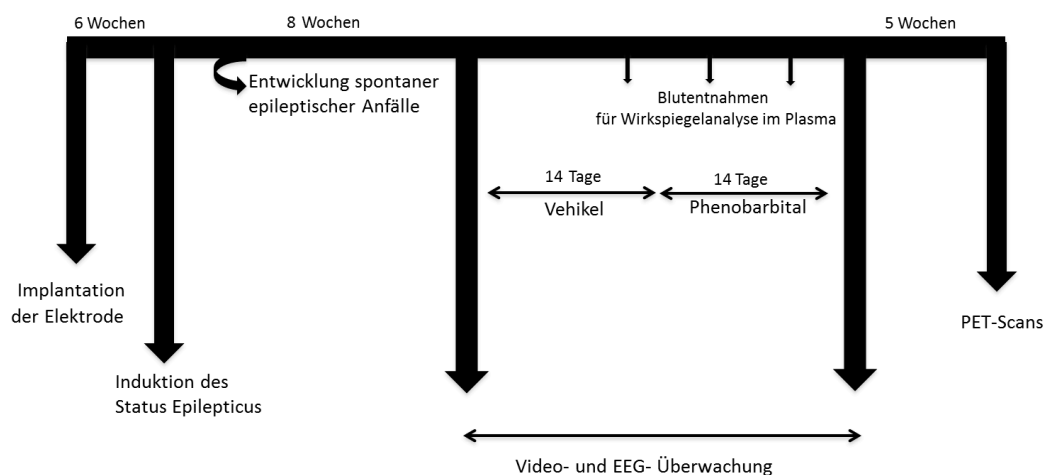


Abbildung 7: Übersicht über das Versuchsdesign und den zeitlichen Ablauf

Die Ratten wurden anschließend zu einer Kooperationsgruppe nach Amsterdam verbracht, wo fünf Wochen später PET-Untersuchungen an acht Kontrolltieren, fünf *Respondern* und sieben *Nonrespondern* folgten. Jedes Tier durchlief einen Transmissionsscan zur späteren Korrektur auf Abschwächung und Streuung, zwei Scans nach jeweiliger Injektion von [^{11}C]Flumazenil (einmal vor und einmal nach

Verabreichung des Pgp-Inhibitors Tariquidar) zur Beurteilung der Funktion des *Multidrug*-Transporters Pgp, einen weiteren *Scan* nach Applikation des Inflammationsmarkers [^{11}C]PK11195, sowie einen *Scan* nach Injektion von ^{18}F FDG zur Festlegung der ROIs. Direkt im Anschluss erfolgte die Dekapitation der Tiere. Die Gehirne wurden sofort aus dem knöchernen Schädel entnommen, die rechte Gehirnhälfte mit Hilfe von flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren immunhistochemischen sowie histologischen Bearbeitung bei -80°C gelagert.

5 Ergebnisse

5.1 *Post-Status epilepticus*-Modell

Eine Tiefenstimulationselektrode wurde bei 75 weiblichen *Sprague Dawley* Ratten dauerhaft in die rechte basolaterale Amygdala (BLA) implantiert (siehe Kap. 4.1.2). Es folgte eine Rekonvaleszenzphase von sechs Wochen. Anschließend wurde bei 41 Tieren ein sich selbst erhaltender *Status epilepticus* (SSSE) durch eine elektrische Dauerstimulation von 25 Minuten induziert (siehe Kap. 4.1.2). Nach vier Stunden wurde die Krampfaktivität durch eine Diazepam-Injektion (10 mg/kg) unterbrochen. Die Diazepam-Applikation wurde bei Bedarf solange wiederholt, bis eine eindeutige Unterbrechung des SSSE eintrat. Von den insgesamt 41 stimulierten Tieren zeigten 93% (n=38) konstant generalisierte Anfälle (SSSE Typ III) und 2% der Tiere (n=1) lediglich fokales Anfallsgeschehen (SSSE Typ I). Bei 5% der Tiere (n=2) konnten fokale Anfälle unterbrochen von einzelnen generalisierten Anfällen (SSSE Typ II) beobachtet werden.

Typ des <i>Status epilepticus</i> (SSSE)	Prozentualer Anteil und Anzahl der stimulierten Tiere (n _{gesamt} = 41)
SSSE Typ I Fokale Anfallsaktivität	2% n=1
SSSE Typ II Fokale Anfallsaktivität unterbrochen von einzelnen generalisierten Anfällen	5% n=2
SSSE Typ III Generalisierte Anfallsaktivität	93% n=38

Tabelle 3: Übersicht über das Auftreten der verschiedenen Typen des SSSE

Im Rahmen der Operation und der darauffolgenden Aufwachphase verstarben vier Tiere, während der Dauerstimulation ein Weiteres. Innerhalb der sechs Wochen zwischen Statusinduktion und Video-/EEG-Überwachung mussten drei Tiere aufgrund ihres schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert werden.

5.1.1 Erfassung spontaner Anfälle während der Vehikelfase

Nach einer Latenzphase von mehreren Wochen entwickelte die Mehrheit der Ratten spontane epileptische Anfälle. Dies ist auf die Entstehung eines hyperexzitablen Netzwerkes im Gehirn durch die Induktion des SSSE zurückzuführen. Zur Erfassung der Anfälle erfolgte bei 20 epileptischen Ratten acht Wochen nach Statusinduktion eine Überwachung per EEG und Video (siehe Kap. 4.1.4). Sowohl während der Vehikel-, als auch während der Selektionsphase wurden 15 Ratten, die als Kontrolltiere dienten, ohne EEG- und Videoüberwachung ebenfalls in Glas-Terrarien verbracht. Dadurch konnte die gleiche Behandlung aller Tiere gewährleistet werden.

Tiere		Anfälle in der Vehikelfase	Anfälle in der Selektionsphase	Anfallsreduktion
<i>Responder</i>	EU 265	2	0	100 %
	EU 266	1	0	100 %
	EU 268	1	0	100 %
	EU 270	1	0	100 %
	EU 290	1	0	100 %
<i>Nonresponder</i>	EU 227	1	1	0 %
	EU 231	16	7	56 %
	EU 262	45	5	89 %
	EU 264	6	1	83 %
	EU 273	6	2	67 %
	EU 285	3	3	0 %
	EU 296	56	8	86 %

Tabelle 4: Anfallshäufigkeit und prozentuale Anfallsreduktion durch Phenobarbital bei *Respondern* und *Nonrespondern* während der Vehikelfase und der Selektionsphase

In der Vehikelphase zeigten 16 der 20 Tiere spontane Anfälle. Die durchschnittliche Anfallsfrequenz betrug bei diesen 16 Tieren 0,8 Anfälle pro Tag. Allerdings wiesen die individuellen Daten eine große Variation auf (0,1 - 4 Anfälle pro Tag). Vier stimulierte Tiere zeigten während der Vehikelphase keine spontanen Anfälle.

5.1.2 Selektion der *Responder* und *Nonresponder*

Im Rahmen einer zweiwöchigen Selektionsphase, welche auf die Vehikelphase folgte, wurden alle epileptischen Tiere entweder der Gruppe der *Responder* oder der Gruppe der *Nonresponder* zugeordnet. Dabei erfolgte bei allen Tieren zweimal täglich eine Phenobarbital (PB)-Applikation. Durch die PB-Behandlung konnte bei fünf Tieren eine komplette Anfallsfreiheit erzielt werden. Diese Tiere wurden als *Responder* klassifiziert. Als *Nonresponder* wurden sieben der insgesamt 20 stimulierten Tiere eingestuft, bei denen durch die Applikation von PB keine vollständige Anfallsfreiheit erreicht wurde. Zwei dieser sieben *Nonresponder* zeigten unter der PB-Behandlung keine Anfallsreduktion. Bei fünf weiteren Tieren, die der Gruppe der *Nonresponder* zugeordnet wurden, kam es zu einer Reduktion der Anfälle um 56%, 66%, 83%, 86% und 89%. Vier Ratten, die weder während der Vehikelphase, noch während der Selektionsphase spontane Anfälle gezeigt hatten, wurden vom Versuch ausgeschlossen. Bei den *Respondern* konnte während der Selektionsphase eine signifikante Reduktion der Anfallsfrequenz im Vergleich zur Vehikelphase festgestellt werden. Dagegen erreichte die Reduktion der Anfallsfrequenz bei *Nonrespondern* keine Signifikanz. Im Verlauf der Selektionsphase verstarb ein Tier. Aufgrund eines schlechten Allgemeinbefindens mussten drei weitere Tiere euthanasiert werden.

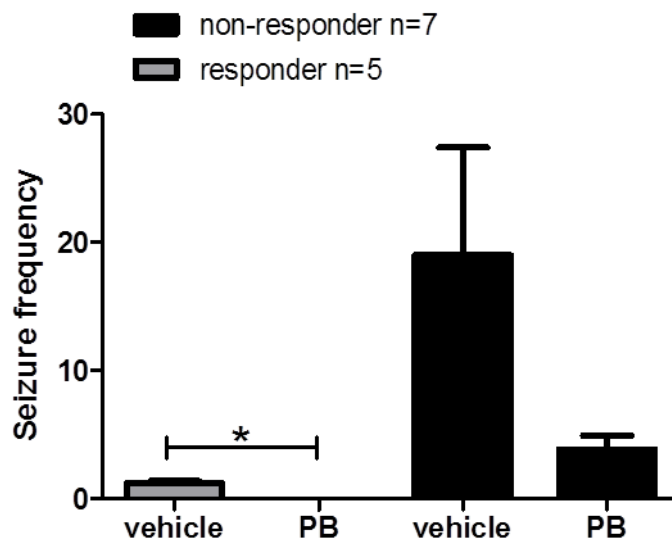


Abbildung 8: Reduktion der Anfallsfrequenz bei *Respondern* und *Nonrespondern* durch Phenobarbital (Mittelwert \pm SEM). Es erfolgte zunächst eine 14tägige Vehikelpphase, an welche sich eine 14tägige Selektionsphase anschloss, in der die Tiere mit Phenobarbital behandelt wurden. Sowohl während der Vehikelpphase, als auch während der Selektionsphase wurden die Tiere kontinuierlich überwacht, wodurch alle spontan auftretenden Anfälle aufgezeichnet werden konnten. In der Abbildung ist die Anzahl der Anfälle (Mittelwert \pm SEM) bei *Respondern* und *Nonrespondern* während der Vehikel- und Selektionsphase vergleichend dargestellt. Bei *Respondern* konnte eine signifikante Reduktion der Anfallsfrequenz während der Selektionsphase festgestellt werden. Bei *Nonrespondern* wurde dagegen keine signifikante Reduktion der Anfallsfrequenz nachgewiesen. (*Responder* n=5; *Nonresponder* n=7). Vehicle = Vehikelpphase; PB = Selektionsphase mit Phenobarbital.

5.1.3 Überprüfung der Phenobarbital-Plasmakonzentration

Zur Überprüfung des PB-Plasmaspiegels wurde allen Tieren an Tag fünf und Tag zwölf der Selektionsphase Blut entnommen. Anschließend wurde mithilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) die PB-Konzentration im Plasma bestimmt. Während der Selektionsphase wiesen sowohl die Kontrolltiere, als auch die epileptischen Tiere PB-Spiegel im therapeutischen Bereich (10-60 $\mu\text{g/ml}$) auf. Die durchschnittlich gemessene PB-Konzentration im Plasma betrug bei den *Respondern* 45,0 $\mu\text{g/ml}$ und bei den *Nonrespondern* 42,6 $\mu\text{g/ml}$. Zwischen den *Respondern* und den *Nonrespondern* konnten keine Unterschiede im Hinblick auf Nebenwirkungen

wie Ataxie und Sedation, die durch die Applikation von PB auftraten, festgestellt werden. Des Weiteren konnten durch die Video- und EEG-Aufzeichnungen auch hinsichtlich der Anfallsschwere keine Unterschiede zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* beobachtet werden.

5.2 PET-Untersuchungen

In Kooperation mit der holländischen Forschergruppe *Division of Pharmacology Leiden / Amsterdam Center for Drug Research* wurden fünf *Responder*, sieben *Nonresponder* und acht Kontrolltiere PET-Untersuchungen im *Department of Nuclear Medicine & PET Research, VU University Medical Center*, Amsterdam, Niederlande unterzogen. Dazu wurden die Tiere fünf Tage nach Abschluss der Selektionsphase nach Amsterdam verbracht. Die PET-Untersuchungen erfolgten dort vier Wochen nach Ankunft der Tiere, um eine Erholung der Ratten vom Transfer zu gewährleisten. Die Auswertung der PET-Daten erfolgte anhand der Software Amide 0.8.22 (LOENING u. GAMBHIR 2003) (siehe Kap. 4.2.3). Zu diesem Zweck wurde ein Summationsbild des [^{18}F]Fluorodeoxyglucose (^{18}FDG)-Scans mit einem Magnetresonanztomographie (MRT)-basierten Atlas des Rattengehirns überlagert, um die zu untersuchenden Bereiche (*regions of interest*, ROIs) zu definieren. Anschließend wurden die fünf ROIs (Hippocampus, Cerebellum, okzipitaler Cortex, parietaler Cortex und *Putamen caudate*) bei den einzelnen Scans auf jedes Zeitfenster projiziert. Daraus ergab sich für jeden Scan eine Zeit-Aktivitätskurve. Um einen Vergleich der Tiere zu ermöglichen, wurde jeweils auf das Körpergewicht sowie die individuell injizierte Aktivität korrigiert. Als Maß für die Anreicherung der Radioaktivität, und somit des *Tracers*, ergab sich so der Wert des *standardized uptake value* (SUV). Die Untersuchungen erfolgten mithilfe der *Tracer* [^{11}C]Flumazenil, [^{11}C]PK11195 und ^{18}FDG .

Es ist zu berücksichtigen, dass die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse auf SUV-Werten basieren. Es sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass bei Anwendung des geplanten Kinetik-Modells, wovon jedoch noch keine vollständigen Daten vorliegen, möglicherweise abweichende Ergebnisse erzielt werden können. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass es bei Vergleich der SUV-basierten Daten mit Kinetik-basierten Daten zu Diskrepanzen, und damit zu voneinander abweichenden Rückschlüssen kommt.

5.2.1 [^{11}C]Flumazenil

Mithilfe von [^{11}C]Flumazenil sollte die Beteiligung des *Multidrug*-Transporters P-Glycoprotein (Pgp) sowie des GABA_A-Rezeptors an Mechanismen der Pharmakoresistenz untersucht werden.

Es erfolgte ein 30minütiger [^{11}C]Flumazenil-Scan vor Applikation des Pgp-Inhibitors Tariquidar und ein weiterer 30minütiger [^{11}C]Flumazenil-Scan im Anschluss daran. Die injizierte Aktivität betrug dabei $15,3 \pm 1,3\text{MBq}$ (Mittelwert \pm SEM) vor und $16,1 \pm 1,9\text{MBq}$ (Mittelwert \pm SEM) nach Injektion von Tariquidar.

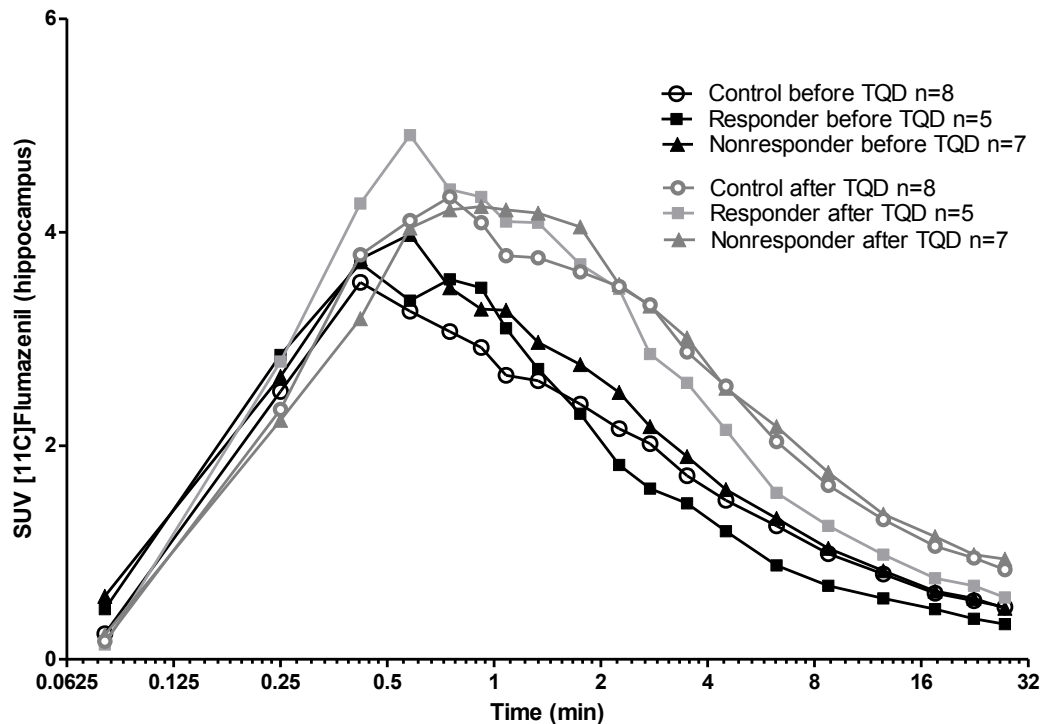


Abbildung 9: Anreicherung des Tracers [^{11}C]Flumazenil im Hippocampus vor und nach Applikation des Pgp-Inhibitors Tariquidar, logarithmisch dargestellt als SUV. Die injizierte Radioaktivität betrug bei dem ersten Scan $15,3 \pm 1,3\text{ MBq}$ (Mittelwert \pm SEM), bei dem zweiten Scan $16,1 \pm 1,9\text{ MBq}$ (Mittelwert \pm SEM). Lediglich zum Zeitpunkt 0,58 min des zweiten Scans zeigten die *Responder* signifikant höhere SUV-Werte als die Kontrolltiere. (Kontrolltiere n=8, *Responder* n=5, *Nonresponder* n=7); before TQD = vor Tariquidar-Applikation, after TQD = nach Tariquidar-Applikation, SUV = *standardized uptake value*

Durch die Tariquidar-Applikation kam es bei allen untersuchten Tiergruppen (Kontrolltiere $n=8$, *Responder* $n=5$, *Nonresponder* $n=7$) zu einem signifikanten Anstieg der Anreicherung von [^{11}C]Flumazenil im Hippocampus. Für die Gesamtdauer der beiden Scans betrug dieser bei Kontrolltieren und *Respondern* jeweils 42%. Bei *Nonrespondern* konnte ein Anstieg von 29% festgestellt werden.

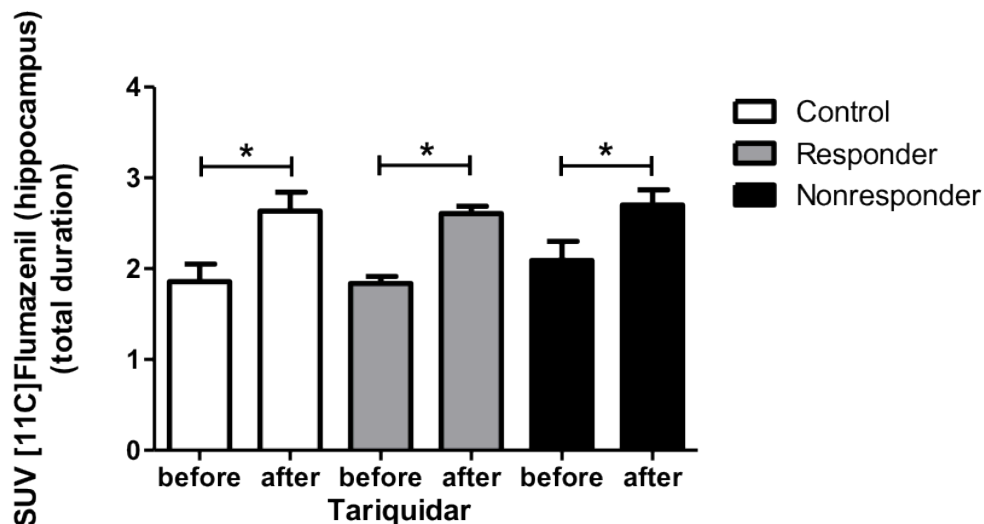


Abbildung 10: Anreicherung des Tracers [^{11}C]Flumazenil im Hippocampus vor und nach Applikation des Pgp-Inhibitors Tariquidar, dargestellt als SUV für die Gesamtdauer des Scans. Sowohl bei Kontrolltieren als auch bei *Respondern* und *Nonrespondern* konnte ein signifikanter Anstieg der Konzentration des Tracers im Hippocampus nach Tariquidar-Injektion nachgewiesen werden. Dieser Anstieg betrug bei Kontrolltieren und *Respondern* jeweils 42%, sowie bei *Nonrespondern* 29%. (Kontrolltiere $n=8$, *Responder* $n=5$, *Nonresponder* $n=7$); before = vor Tariquidar-Applikation, after = nach Tariquidar-Applikation, SUV = *standardized uptake value*

Zu keinem Zeitpunkt des [^{11}C]Flumazenil-Scans vor Tariquidar-Applikation konnte im Hippocampus ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren, *Respondern* und *Nonrespondern* nachgewiesen werden.

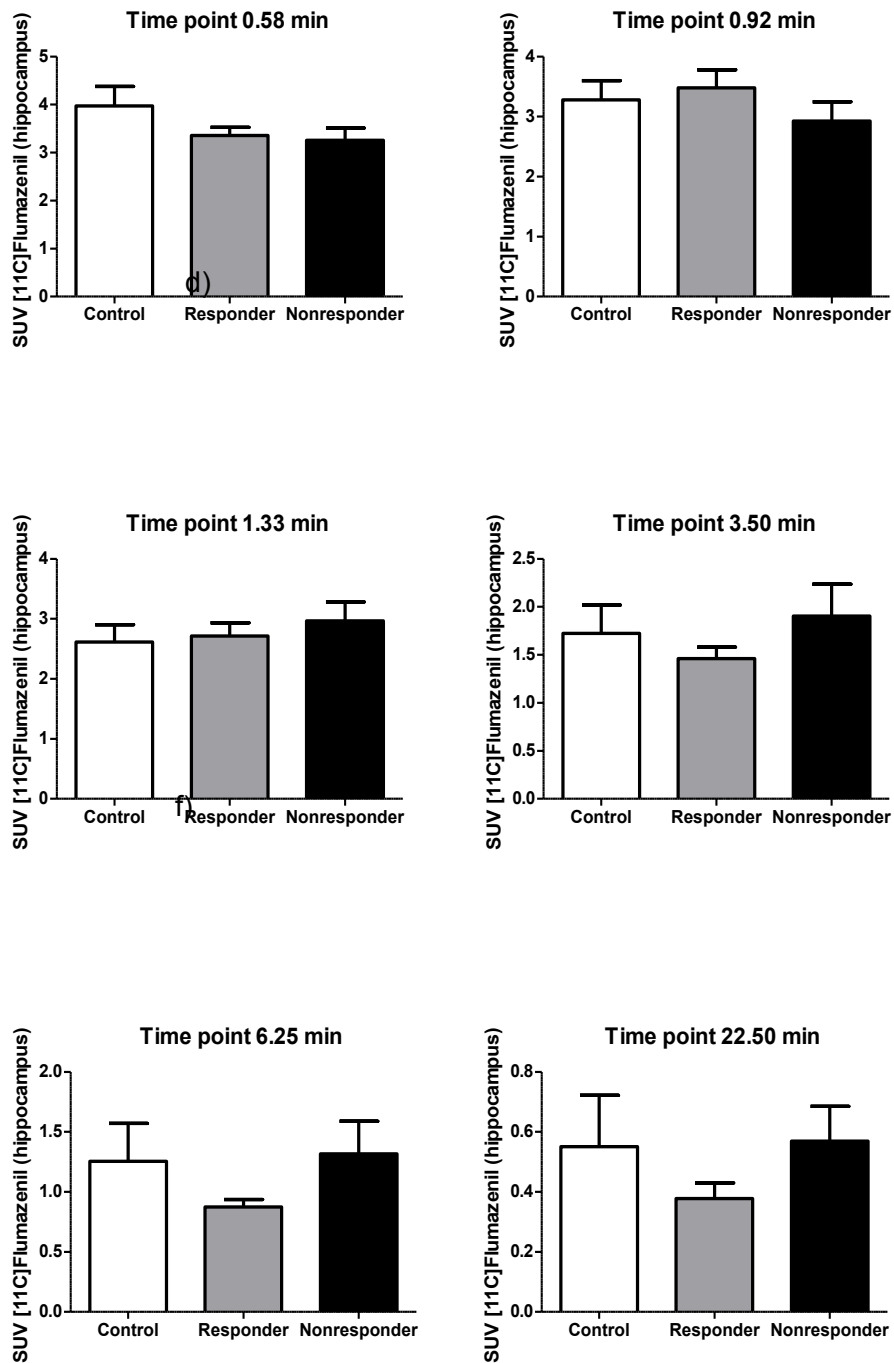


Abbildung 11: Anreicherung des Tracers $[^{11}\text{C}]\text{Flumazenil}$ im Hippocampus, dargestellt als SUV zu den Zeitpunkten 0.58 min, 0.92 min, 1.33 min, 3.50 min, 6.25 min und 22.50 min des Scans vor Tariquidar-Applikation. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren, Respondern und Nonrespondern nachgewiesen werden. (Kontrolltiere n=8, Responder n=5, Nonresponder n=7); SUV = *standardized uptake value*

Während des zweiten [^{11}C]Flumazenil-Scans, welcher nach Inhibition des Pgp durch Tariquidar erfolgte, wiesen die *Responder* zum Zeitpunkt 0,58 min im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant höhere Anreicherung des *Tracers* [^{11}C]Flumazenil auf. Zu allen anderen Zeitpunkten sowie für die Gesamtdauer der beiden [^{11}C]Flumazenil-Scans konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren, *Respondern* und *Nonrespondern* nachgewiesen werden.

5.2.2 [^{11}C]PK11195

Mithilfe des *Tracers* [^{11}C]PK11195, einem Liganden des *translocator protein* (TSPO), kann das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung bei Inflammationsprozessen bildlich dargestellt werden. Die angewandte Dosis des *Tracers* betrug $13,3 \pm 1,9 \text{ MBq}$ (Mittelwert $\pm \text{SEM}$). Auf die Injektion des [^{11}C]PK11195 folgte ein 60minütiger Emissionsscan. Aufgrund der äußerst schwierigen Synthese des *Tracers* konnten nur sieben Kontrolltiere, fünf *Responder* und sechs *Nonresponder* einem [^{11}C]PK11195-Scan unterzogen werden.

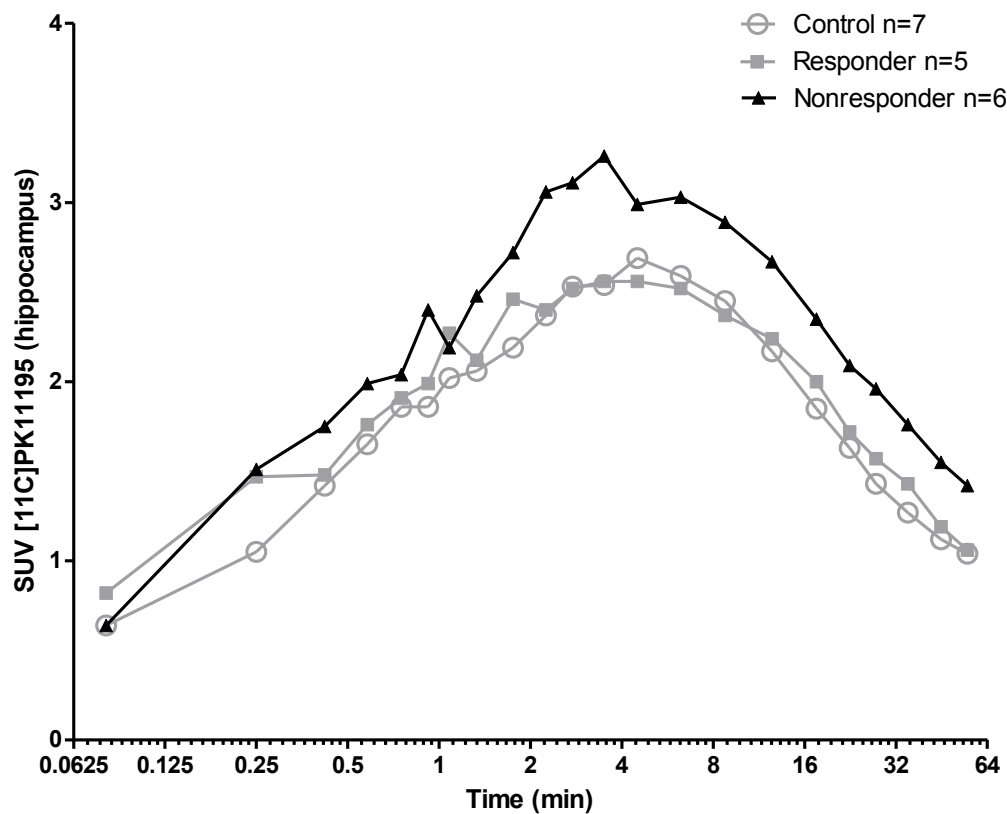


Abbildung 12: Anreicherung des *Tracers* [^{11}C]PK11195 im Hippocampus, logarithmisch dargestellt als SUV. Die injizierte Radioaktivität betrug $13,3 \pm 1,99 \text{ MBq}$ (Mittelwert $\pm \text{SEM}$). (Kontrolltiere $n=7$, *Responder* $n=5$, *Nonresponder* $n=6$); SUV = *standardized uptake value*

a)

Im Hippocampus konnte über die gesamte Dauer des *Scans* sowie innerhalb der Zeitintervalle 2,25 - 3,50 min und 17,50 - 55,00 min eine signifikant höhere Anreicherung des *Tracers* bei den *Nonrespondern* im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden.

b)

c)

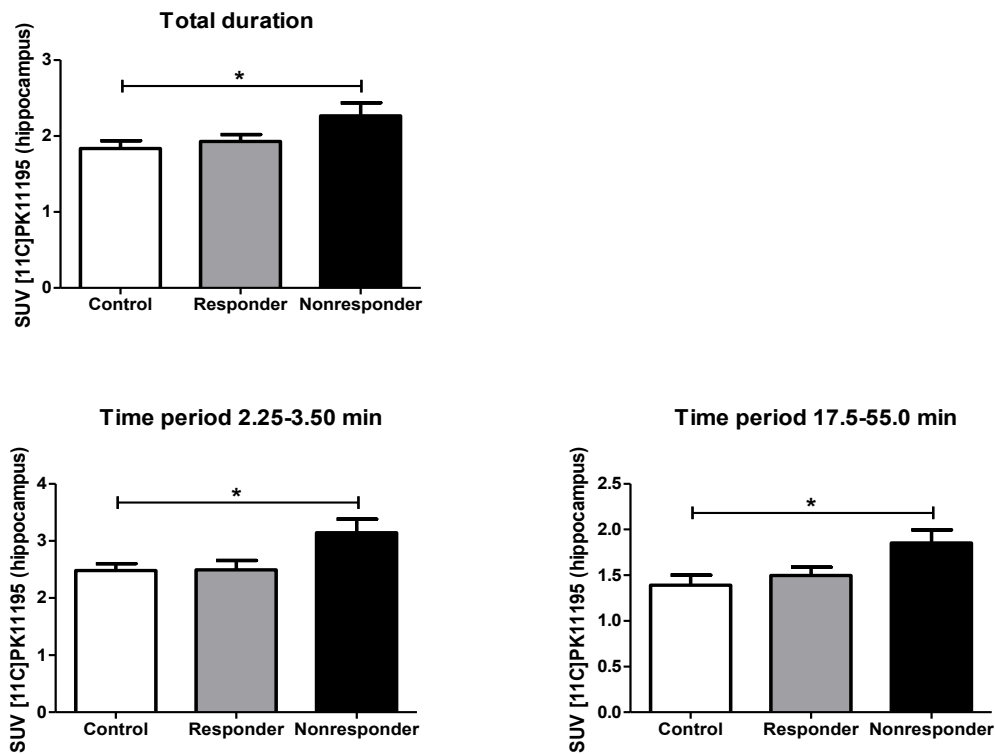


Abbildung 13: Anreicherung des *Tracers* [^{11}C]PK11195 im Hippocampus, dargestellt als SUV für die Gesamtdauer des *Scans*, das Zeitintervall 2,25 - 3,50 min sowie das Zeitintervall 17,5 - 55,0 min. Sowohl für die Gesamtdauer des *Scans* als auch für beide Zeitintervalle konnte eine signifikant höhere Anreicherung des *Tracers* bei *Nonrespondern* im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden. (Kontrolltiere $n=8$, *Responder* $n=5$, *Nonresponder* $n=7$); SUV = *standardized uptake value*

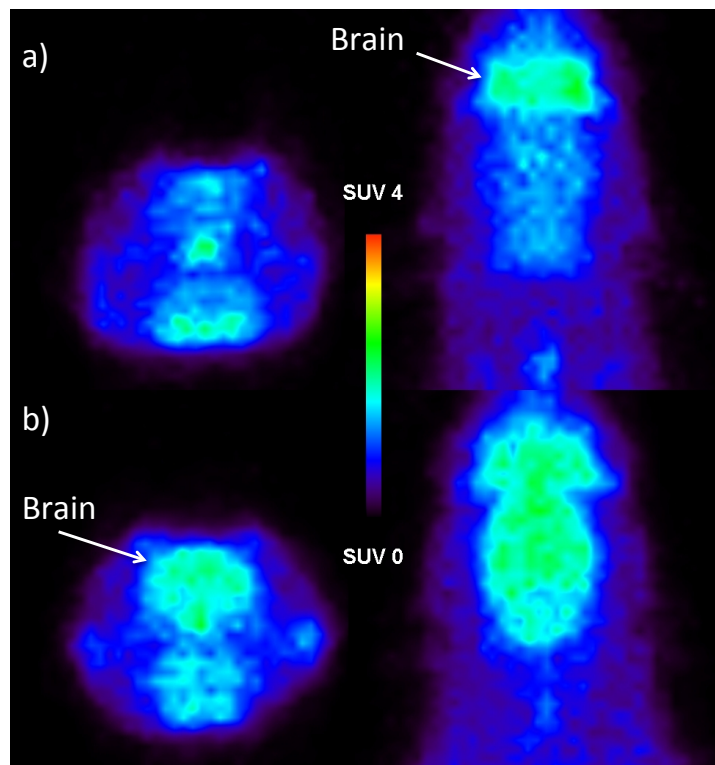


Abbildung 14: Coronale (links) sowie horizontale (rechts) Ansicht eines PET-Scans zur Darstellung der Verteilung des Tracers $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ im Gehirn eines Kontrolltieres (a) und eines *Nonresponders* (b). Im Gehirn des *Nonresponders* ist eine im Vergleich zu dem Kontrolltier erhöhte $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ -Aufnahme zu erkennen. SUV = *standardized uptake value*

5.2.3 $[^{18}\text{F}]\text{Fluorodeoxyglucose}$

Der Tracer $[^{18}\text{F}]\text{Fluorodeoxyglucose}$ (^{18}FDG) wird in der nuklearmedizinischen Diagnostik sehr häufig verwendet, um den regionalen Glukoseverbrauch in verschiedenen Geweben zu evaluieren. Im Anschluss an die Untersuchungen mit den Tracern $[^{11}\text{C}]\text{Flumazenil}$ und $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ wurde bei jedem Tier ein 60minütiger ^{18}FDG -Scan durchgeführt. Die Daten, die mithilfe dieses Scans erhoben wurden, wurden unter anderem dazu genutzt, die zu untersuchenden Regionen (*regions of interest*, ROIs) zu bestimmen. Dies geschah durch Überlagerung der PET-Bilder mit einem MRT-basierten Atlas des Rattengehirns. Dadurch konnte die genaue Aktivitätsverteilung aller getesteten Tracer im Hippocampus beurteilt werden.

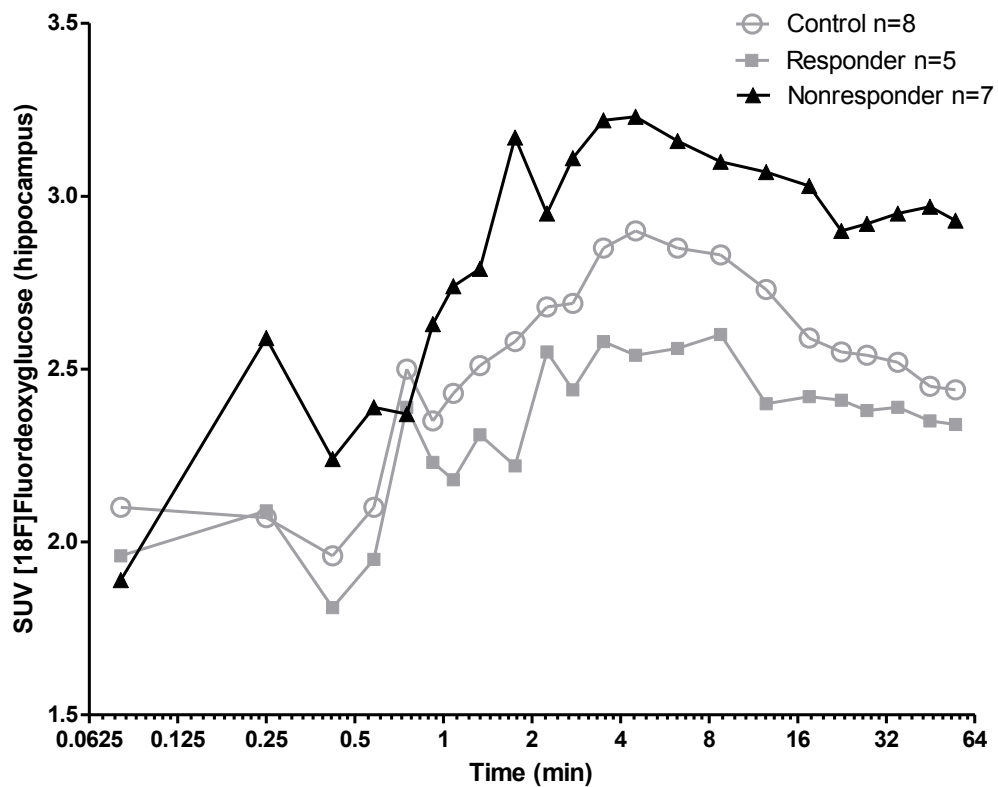


Abbildung 15: Anreicherung des Tracers ^{18}F FDG im Hippocampus, logarithmisch dargestellt als SUV. Die injizierte Aktivität betrug $11,0 \pm 1,32$ MBq (Mittelwert \pm SEM). (Kontrolltiere $n=8$, Responder $n=5$, Nonresponder $n=7$); SUV = *standardized uptake value*

Die injizierte Aktivität betrug $11,0 \pm 1,32$ MBq (Mittelwert \pm SEM). Zu den Zeitpunkten 1,75 min, 2,75 min, 3,50 min, 4,50 min, 6,25 min und 12,50 min sowie innerhalb des Zeitintervalls von 1,75 - 12,50 min wies die Tiergruppe der *Nonresponder* im Vergleich zur Tiergruppe der *Responder* eine signifikant höhere Anreicherung des Tracers ^{18}F FDG im Hippocampus auf.

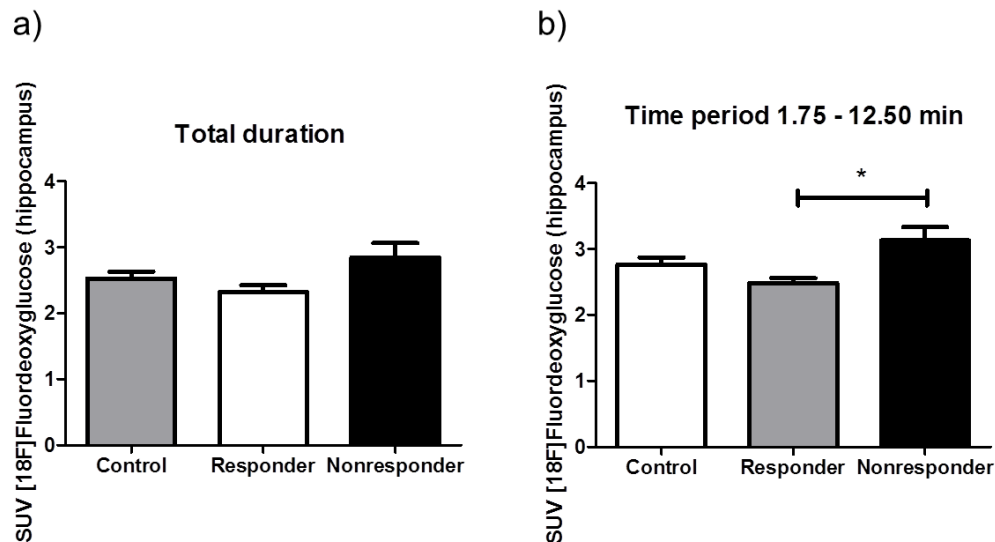


Abbildung 16: Anreicherung des Tracers ^{18}F FDG im Hippocampus, dargestellt als SUV. Für die Gesamtdauer des Scans konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren, *Respondern* und *Nonrespondern* nachgewiesen werden. Innerhalb des Zeitintervalls 1,75 - 12,50 min wies die Gruppe der *Nonresponder* im Vergleich zur Tiergruppe der *Responder* eine signifikant erhöhte Anreicherung des Tracers ^{18}F FDG auf. (Kontrolltiere n=8, Responder n=5, Nonresponder n=7); SUV = *standardized uptake value*

5.2.4 Korrelation zwischen Anreicherung der Tracer und Anfallsreduktion

Im Anschluss an die Auswertung der Anreicherung der Tracer ^{11}C Flumazenil, ^{11}C PK11195 und ^{18}F FDG wurde eine mögliche Korrelation zwischen der Anreicherung der einzelnen Tracer und der Anfallsreduktion der Tiere durch die Phenobarbital-Applikationen überprüft. Die SUV-Werte des Tracers ^{11}C Flumazenil korrelierten weder vor noch nach der Applikation von Tariquidar signifikant mit der Anfallsreduktion der Tiere während der Phenobarbitalphase. Ebenso konnte keine Korrelation zwischen den SUV-Werten der Tracer ^{11}C PK11195 und ^{18}F FDG und der Anfallsreduktion der einzelnen Tiere in der Phenobarbitalphase nachgewiesen werden.

5.3 Histologie und Immunhistochemie

5.3.1 P-Glycoprotein

Mithilfe einer immunhistochemischen Färbemethode wurde die P-Glycoprotein (Pgp)-Expression in den Bregmaregionen -2,3; -3,8 und -5,8 des Hippocampus quantifiziert. Dabei wurde sowohl die optische Dichte (OD), als auch die Fläche des Pgp-positiven Signals (*area*) im Bereich des Hilus des *Gyrus dentatus*, der CA₁- und CA₃-Region des Hippocampus, des piriformen Cortex sowie des parietalen Cortex bestimmt. Die *area* wird in Prozent relativ zur Gesamtgröße des Messfeldes angegeben.

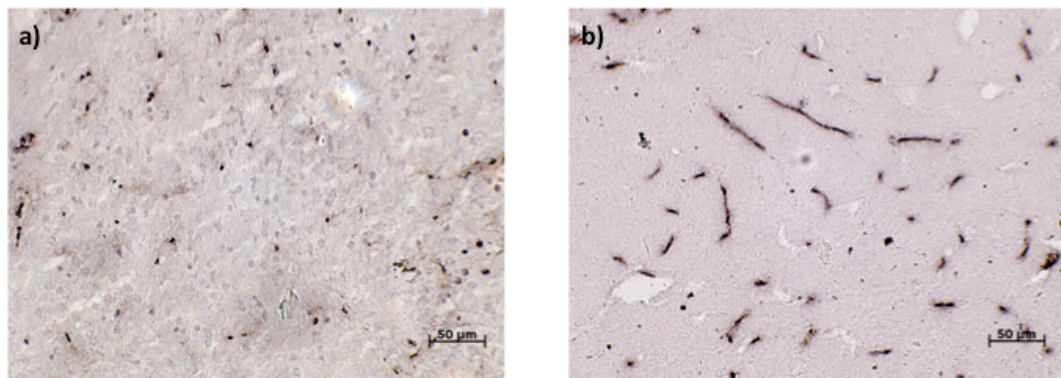


Abbildung 17: Endotheliale Pgp-Expression im piriformen Cortex eines Kontrolltieres (a) und eines *Nonresponders* (b). Im piriformen Cortex des *Nonresponders* ist eine erhöhte Pgp-Expression im Vergleich zu dem Kontrolltier zu sehen.

Hinsichtlich der OD wies die Gruppe der *Responder* in der CA₃-Region (Bregma -2,3) signifikant höhere Werte auf als die Gruppe der Kontrolltiere. Des Weiteren konnte im Bereich des piriformen Cortex (Bregma -5,8) eine signifikante Erhöhung der OD bei der Gruppe der *Nonresponder* im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden.

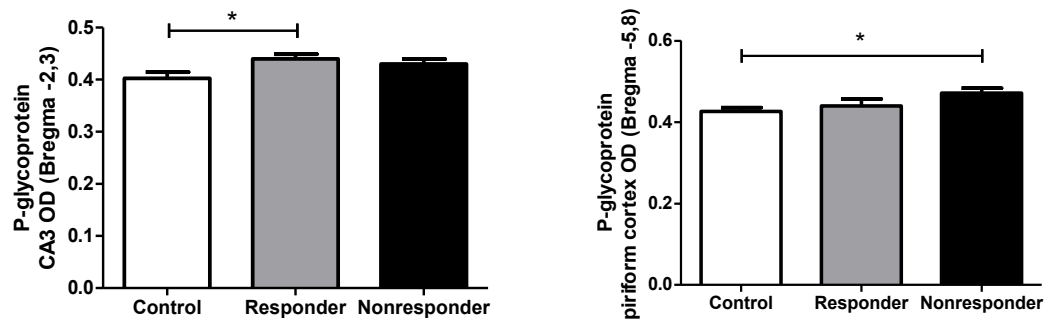


Abbildung 18: Expression des *Multidrug*-Transporters Pgp. Werte der optischen Dichte (OD) (Mittelwert \pm SEM), dargestellt in der CA₃-Region des Hippocampus (Bregma -2,3) sowie im piriformen Cortex (Bregma -5,8). Im Vergleich zu den Kontrolltieren wies die Gruppe der *Responder* in der CA₃-Region signifikant höhere OD-Werte auf, während die Gruppe der *Nonresponder* im piriformen Cortex signifikant erhöhte OD-Werte gegenüber der Gruppe der Kontrolltiere zeigte. (Kontrolltiere n=8, *Responder* n=5, *Nonresponder* n=7); CA = *Cornu ammonis*

Im Hinblick auf die Messung der OD konnten weder im Bereich des Hilus des *Gyrus dentatus*, noch in der CA₁-Region des Hippocampus oder im Bereich des parietalen Cortex signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen verzeichnet werden. Im Hinblick auf die *area*, d.h. die Fläche des Pgp-positiven Signals im Verhältnis zur Gesamtgröße des Messfeldes, konnte in keiner der untersuchten Regionen ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren, *Respondern* und *Nonrespondern* festgestellt werden.

5.3.2 Korrelation zwischen Pgp-Expression und Anfallsfrequenz

Zudem wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen den OD-Werten der immunhistochemischen Quantifizierung der Pgp-Expression und der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelfase bestand. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Anfallsfrequenz während der Vehikelfase und den OD-Werten nachgewiesen werden.

5.3.3 γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors

Zur Quantifizierung der Expression der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors wurde anhand von immunhistochemisch gefärbten Schnitten die optische Dichte (OD) und die Fläche des γ_2 -positiven Signals (*area*) im Bereich des *Gyrus dentatus*, des Hilus des *Gyrus dentatus* sowie in der CA₁- und CA₃-Region des Hippocampus gemessen. Dabei wurden jeweils die Bregmaregionen -2,4; -4,0 und -5,7 zur Auswertung herangezogen.

Im Hinblick auf die OD konnten in der CA₁-Region der Bregmaregionen -4,0 und -5,7 signifikant niedrigere Werte bei den *Respondern* im Vergleich zu den *Nonrespondern* nachgewiesen werden. Hinsichtlich aller weiteren untersuchten Regionen waren keine signifikanten Unterschiede der OD zwischen den einzelnen Tiergruppen zu verzeichnen.

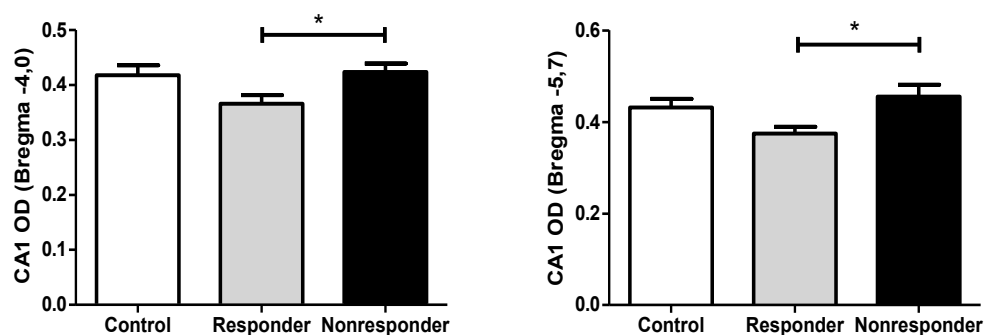


Abbildung 19: Expression der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors in der CA₁-Region des Hippocampus, dargestellt in Werten der optischen Dichte (OD). Es konnten in der CA₁-Region (Bregma -4,0 und -5,7) signifikant niedrigere OD-Werte bei den *Respondern* im Vergleich zu den *Nonrespondern* festgestellt werden. (Kontrolle n=8, *Responder* n=5, *Nonresponder* n=7); CA = *Cornu ammonis*

Im Hinblick auf die Fläche des γ_2 -positiven Signals im Verhältnis zur Gesamtgröße des Messfeldes (*area*) konnten im Hilus des *Gyrus dentatus* (Bregma -2,4) signifikant niedrigere Werte bei den *Respondern* verglichen mit der Gruppe der

Nonresponder nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten in der Region des *Gyrus dentatus* (Bregma -4,0) signifikant höhere *area*-Werte bei den *Respondern* im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden.

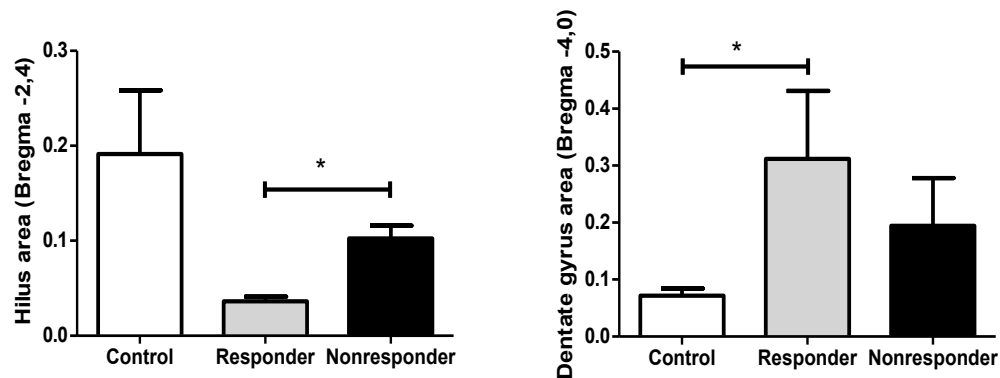


Abbildung 20: Expression der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors. Dargestellt ist die Messung der *area* (Fläche des γ_2 -positiven Signals relativ zur Gesamtgröße des Messfeldes). In der Bregmaregion -2,4 des Hilus des *Gyrus dentatus* zeigte die Tiergruppe der *Responder* signifikant niedrigere Werte als die Gruppe der *Nonresponder*. In der Bregmaregion -4,0 des *Gyrus dentatus* konnten signifikant höhere *area*-Werte bei den *Respondern* im Vergleich zu den *Nonrespondern* nachgewiesen werden. (Kontrolltiere n=8, *Responder* n=5, *Nonresponder* n=7)

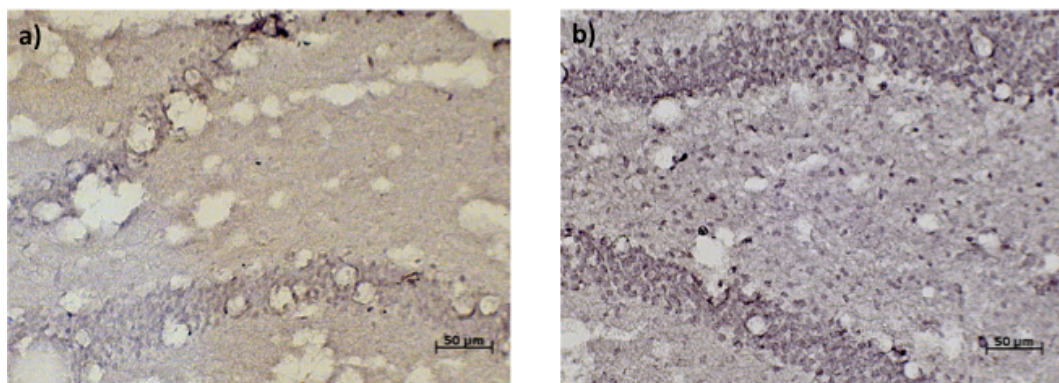


Abbildung 21: Expression der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors im Hilus des *Gyrus dentatus* bei einem *Responder* (a) und einem *Nonresponder* (b). Bei dem *Responder* ist eine deutlich niedrigere Expression der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors im Hilus des *Gyrus dentatus* erkennbar.

Bei den hier aufgeführten Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchung der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors handelt es sich um präliminäre Daten. Im Anschluss an die computergestützte Auswertung der OD sowie der *area* sollte eine stereologische Zellzählung zur exakteren Quantifizierung der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors erfolgen. Diese Untersuchungen sind jedoch noch nicht abgeschlossen.

5.3.4 Korrelation zwischen γ_2 -Expression und Anfallsfrequenz

Zudem wurde überprüft ob eine Korrelation zwischen den Werten der immunhistochemischen Quantifizierung der γ_2 -Expression und der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelfase bestand. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Expression der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelfase nachgewiesen werden.

5.3.5 Nissl-Färbung

Zur Evaluierung der Neurodegeneration wurde eine Nissl-Färbung durchgeführt. Mithilfe eines *Scoring*-Systems wurden die CA₁-, CA₂-, CA₃- und CA₄- Region des Hippocampus sowie der piriforme und parietale Cortex beurteilt. Die auftretenden Läsionen wurden dabei folgendermaßen kategorisiert: keine offensichtlichen Läsionen (0), schwaches Auftreten von Läsionen, d.h. Zellverluste von weniger als 20% der Neuronen (1), Läsionen mit Einbezug von 20-50% der Neuronen (2), Läsionen mit Einbezug von mehr als 50% der Neuronen (3).

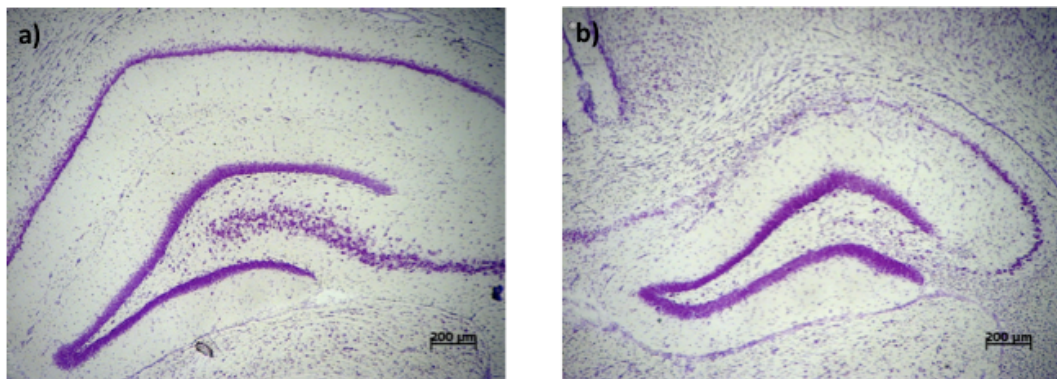


Abbildung 22: Nissl-Färbung zur Evaluierung der Neurodegeneration im Bereich des Hippocampus eines Kontrolltieres (a) und eines epileptischen Tieres. In der CA₁- sowie CA₃-Region des Hippocampus des epileptischen Tieres sind deutliche Neuronenverluste im Vergleich zu dem nicht-epileptischen Kontrolltier erkennbar.

Tiergruppe	Region					
	CA ₁	CA ₂	CA ₃	CA ₄	C _{pir}	C _{par}
Kontrolltiere n=8	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	1	0
Mittelwert	0,13	0	0	0	0,13	0
Responder n=5	3	1	3	1	3	0
	3	0	2	1	1	0
	2	2	2	1	1	0
	2	1	2	1	2	0
	2	0	1	0	2	0
Mittelwert	2,4	0,8	2,0	0,8	1,8	0
Nonresponder n=7	1	0	0	0	0	0
	3	3	3	3	3	0
	2	0	2	0	0	0
	1	0	1	0	0	0
	3	3	3	3	2	0
	3	0	2	0	0	0
	2	1	2	0	2	0
Mittelwert	2,14	1,0	1,86	0,86	1,0	0

Tabelle 5: Übersicht über die Ergebnisse der Evaluierung der Neurodegeneration mithilfe eines *Scoring-Systems*. Auftretende Läsionen wurden nach dem folgenden Schema kategorisiert: keine offensichtlichen Läsionen (0), schwaches Auftreten von Läsionen, d.h. Zellverluste von weniger als 20% der Neuronen (1), Läsionen mit Einbezug von 20-50% der Neuronen (2), Läsionen mit Einbezug von mehr als 50% der Neuronen (3). CA = *Cornu ammonis*, C_{pir} = *Cortex piriformis*, C_{par} = *Cortex parietalis*

In der CA₁- und CA₃-Region des Hippocampus, sowie im piriformen und im parietalen Cortex konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und *Respondern* nachgewiesen werden. Die Gruppe der *Responder* wies signifikant höhere Werte auf. Bei *Nonrespondern* konnte lediglich in der CA₁- und CA₃-Region ein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren verzeichnet

werden. Zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* konnte in keiner der untersuchten Regionen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

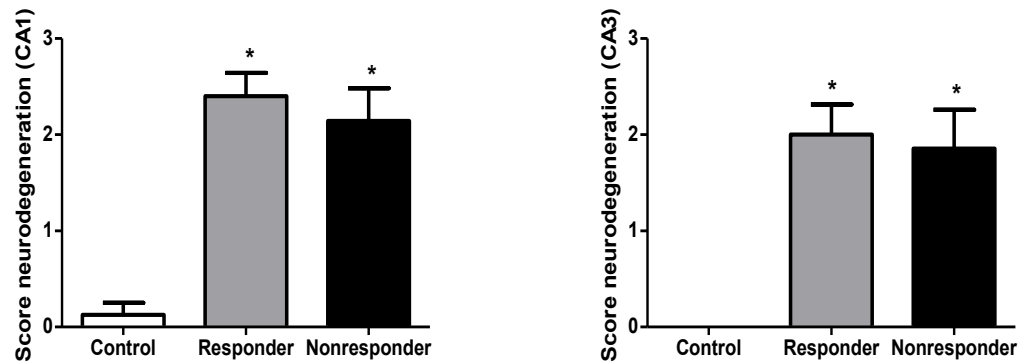


Abbildung 23: Erfassung der Neurodegeneration mithilfe eines *Scoring-Systems*, dargestellt in den Regionen CA₁ und CA₃ des Hippocampus. Sowohl *Responder* als auch *Nonresponder* wiesen in diesen Regionen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant höhere Werte auf. (Kontrolltiere n=8, *Responder* n=5, *Nonresponder* n=7); CA = *Cornu Ammonis*, *signifikant zur Kontrollgruppe

5.3.6 Korrelation zwischen Neurodegeneration und Anfallsfrequenz

Es konnte keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Neurodegeneration und der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelfase nachgewiesen werden. Zudem bestand keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Neurodegeneration und der prozentualen Anfallsreduktion während der Phenobarbital-Behandlung.

6 Diskussion

Sowohl bei Hund und Katze, als auch beim Menschen stellt die Epilepsie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems dar (BROWNE u. HOLMES 2001; DEWEY 2006). Weltweit sind etwa 70 Millionen Menschen davon betroffen (NGUGI et al. 2010). Die Therapie der Wahl ist meist eine lebenslange Medikation mit antikonvulsiv wirksamen Pharmaka, die jedoch häufig nicht zur vollständigen Anfallsfreiheit führt. Trotz der Tatsache dass kontinuierlich neue Antiepileptika auf den Markt gebracht werden, bleibt jedoch das Problem der Therapieresistenz bei Epilepsiepatienten bestehen (POTSCHKA 2010b). So kann bei mehr als 30% der Veterinär- und Humanpatienten mithilfe der Pharmakotherapie keine ausreichende Anfallskontrolle erreicht werden (HITIRIS et al. 2007; WEISSL et al. 2012). Es wird angenommen, dass es sich bei den Mechanismen, die der Pharmakoresistenz zugrunde liegen, um ein komplexes und multifaktorielles Geschehen handelt (POTSCHKA 2010c). Deshalb wurden zur Erklärung dieser Mechanismen verschiedene Hypothesen formuliert. Die *Target*-Hypothese schreibt den Grund der Therapieresistenz einer Veränderung der molekularen Zielstrukturen der Antiepileptika zu (REMY u. BECK 2006). Die *Multidrug*-Transporter-Hypothese hingegen stützt sich auf eine Überexpression von Effluxtransportern an der Blut-Hirn-Schranke, wodurch die Verfügbarkeit der Wirkstoffe im Gehirnparenchym limitiert wird (POTSCHKA 2010c). Des Weiteren können sich Inflammationsprozesse im zentralen Nervensystem auf die Progression, den Schweregrad und damit auf die Therapierbarkeit der Erkrankung auswirken (VEZZANI et al. 2011a). Vermutlich sind verschiedene Faktoren in individuell unterschiedlichem Maße an der Ausprägung therapierefraktärer Epilepsien beteiligt (KWAN u. BRODIE 2006). Die Möglichkeit schwer behandelbare Epilepsien und die zugrunde liegende Ursache frühzeitig identifizieren zu können, wäre eine ideale Voraussetzung für ein optimiertes und individualisiertes Patientenmanagement (POTSCHKA 2010b). Auf diese Weise könnten nicht-pharmakologische Behandlungsstrategien zu einem früheren Zeitpunkt in Betracht gezogen werden (POTSCHKA 2010b). Die

frühzeitige Entscheidung zu alternativen Therapiestrategien wie beispielsweise einem chirurgischen Eingriff oder der Vagusnervstimulation kann sich erheblich auf den Behandlungserfolg auswirken (SCHACHTER 2002; KWAN u. SPERLING 2009). Die nicht-invasive bildgebende Methode der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bietet die Möglichkeit, mithilfe von radioaktiv markierten Substanzen Stoffwechselprozesse im Organismus nachzuvollziehen (CHING et al. 2012). Mithilfe geeigneter *Radiotracer* kann so die Funktion des Effluxtransporters P-Glycoprotein (Pgp) und der GABA_A-Rezeptoren, sowie das Ausmaß inflammatorischer Prozesse beurteilt werden. Auf diese Weise bietet die PET die Möglichkeit, Mechanismen der Pharmakoresistenz zu untersuchen und therapieresistente Individuen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt zu identifizieren.

Im Rahmen dieses Dissertationsprojektes wurden verschiedene Bildgebungskonzepte angewendet, um die Möglichkeit der Darstellung der Therapieresistenz bei epileptischen Ratten im Rahmen einer PET-Untersuchung zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden in einem elektrischen *Status epilepticus* (SE)-Modell therapiesensitive (*Responder*) und therapieresistente (*Nonresponder*) Ratten mithilfe des Antiepileptikums Phenobarbital selektiert. Im Anschluss daran wurden alle Tiere PET-Untersuchungen mithilfe der *Radiotracer* [¹¹C]Flumazenil, [¹¹C]PK11195 und [¹⁸F]Fluorodeoxyglucose (¹⁸FDG) unterzogen. Das Ziel der Untersuchungen war herauszufinden, ob zwischen den verschiedenen Tiergruppen (Kontrolltiere, *Responder*, *Nonresponder*) Unterschiede auftreten, welche die bildgebende Darstellung der Pharmakoresistenz anhand der Pgp-Funktion, der Expression des GABA_A-Rezeptors oder des Inflammationsgeschehens im Gehirn möglich machen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Studie jeweils im Hinblick auf den potentiellen der Pharmakoresistenz zugrunde liegenden Mechanismus diskutiert. Zunächst wird auf die Untersuchungen eingegangen, welche im Zusammenhang mit der *Multidrug*-Transporter-Hypothese stehen, und anschließend auf solche welche in Verbindung mit der *Target*-Hypothese stehen. Im Anschluss daran erfolgt die Erläuterung der Ergebnisse, welche Aussagen im Hinblick auf das zerebrale Inflammationsgeschehen erlauben. Des Weiteren wird

auf die Interaktionen und die gegenseitige Beeinflussung der genannten Faktoren eingegangen.

6.1 Untersuchungen im Hinblick auf die *Multidrug*-Transporter-Hypothese

Die Selektion der Ratten in *Responder* und *Nonresponder* erfolgte mithilfe des Antiepileptikums Phenobarbital (PB). Da PB ein Substrat des *Multidrug*-Transporters Pgp darstellt, bietet die Pgp-Überexpression und die daraus resultierende mangelhafte PB-Gehirnpenetration eine Erklärung für die Pharmakoresistenz der *Nonresponder* (SCHUETZ et al. 1996; POTSCHKA et al. 2002; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c). Bereits in früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Gehirngängigkeit von PB durch eine erhöhte Pgp-Expression reduziert wird (SCHUETZ et al. 1996; POTSCHKA et al. 2002; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005b). Eine nicht ausreichende Wirkstoffverabreichung als Ursache für den mangelhaften Therapieerfolg bei *Nonrespondern* konnte ausgeschlossen werden, indem die PB-Plasmakonzentration bei allen Tieren bestimmt wurde. Dabei wiesen sowohl die *Responder* als auch die *Nonresponder* PB-Plasmaspiegel im therapeutischen Bereich auf.

Zur Untersuchung der Pgp-Funktion im Hinblick auf die *Multidrug*-Transporter-Hypothese wurden PET-Scans mithilfe des Tracers [^{11}C]Flumazenil durchgeführt (Abbildung 9). Dabei handelt es sich um ein Substrat des Effluxtransporters Pgp, dessen Funktion bzw. Expression quantifiziert werden sollte. Zu diesem Zweck durchlief jedes Tier jeweils einen [^{11}C]Flumazenil-Scan vor und einen weiteren nach Verabreichung des potenten Pgp-Inhibitors Tariquidar (LUNA-TORTOS et al. 2008). Für die Bestimmung der zu untersuchenden Regionen (*regions of interest*, ROIs) zur Auswertung der PET-Scans erfolgte außerdem bei jedem Tier ein ^{18}F FDG PET-Scan. Im Anschluss an die PET-Untersuchungen wurde eine immunhistochemische Färbung zur Quantifizierung der Pgp-Expression durchgeführt.

Durch die Hemmung des Pgp kam es bei allen Tiergruppen zu einem signifikanten

Anstieg der [^{11}C]Flumazenil-Anreicherung im Hippocampus (Abbildung 10). Dies weist darauf hin, dass [^{11}C]Flumazenil ein Substrat des *Multidrug*-Transporters Pgp darstellt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer vorherigen Studie, in der bereits gezeigt werden konnte, dass die zerebrale [^{11}C]Flumazenil-Aufnahme Veränderungen der Pgp-Aktivität reflektieren kann (FROKLAGE et al. 2012). In dieser Studie war ebenfalls ein deutlicher Anstieg der [^{11}C]Flumazenil-Anreicherung nach der Hemmung des Pgp durch Tariquidar zu verzeichnen (FROKLAGE et al. 2012). In der vorliegenden Studie traten weder im basalen [^{11}C]Flumazenil-Scan, d.h. vor Verabreichung von Tariquidar, noch im Anschluss an die Tariquidar-Applikation signifikante Unterschiede in der Anreicherung des Tracers zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* auf (Abbildung 9). Bereits vor Applikation von Tariquidar wiesen die *Nonresponder* keine signifikant niedrigeren SUV-Werte (*standardized uptake value*) auf als die *Responder* (Abbildung 11), was bei einer erhöhten Pgp-Aktivität der *Nonresponder* zu erwarten gewesen wäre. Deshalb kann aus diesen PET-Untersuchungen kein Rückschluss auf Unterschiede in der Pgp-Aktivität zwischen den verschiedenen Tiergruppen gezogen werden.

Um die Ergebnisse der Pgp-Expression zu verifizieren, wurde diese zusätzlich immunhistochemisch quantitativ bestimmt. Bei der Tiergruppe der *Nonresponder* konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren im piriformen Cortex (Bregma -5,8) eine höhere optische Dichte nachgewiesen werden (Abbildung 18). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression eine Ursache der Pharmakoresistenz darstellt (SEEGERS et al. 2002; POTSCHKA 2010c). Es existiert eine Vielzahl an Studien, welche die *Multidrug*-Transporter-Hypothese unterstützen. So konnte im Rahmen früherer Studien bereits nachgewiesen werden, dass die epileptische Anfallsaktivität zu einer gesteigerten Pgp-Expression führt (SEEGERS et al. 2002; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005c). Einige Studien weisen zudem darauf hin, dass zwischen der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression an der Blut-Hirn-Schranke und der Pharmakoresistenz bei Epilepsiepatienten ein kausaler Zusammenhang besteht (POTSCHKA 2010c). Des Weiteren konnte in chronischen Epilepsiemodellen eine signifikante Überexpression des Pgp in den Endothelzellen der Blut-Hirn-

Schranke bei *Nonrespondern* im Vergleich zu *Respondern* nachgewiesen werden (POTSCHKA et al. 2004; VOLK u. LOSCHER 2005; VOLK et al. 2006). Im Rahmen bisheriger Studien konnte ferner durch pharmakologische Modulation des Pgp bereits eine verbesserte Effektivität von Antiepileptika bis hin zur Überwindung der Pharmakoresistenz erreicht werden (CLINCKERS et al. 2005; BRANDT et al. 2006; VAN VLIET et al. 2006). Als neuer therapeutischer Ansatz wurde die Signalkaskade, welche zur Induktion des Pgp führt, an verschiedenen Stellen blockiert. Dadurch sollte der anfallsinduzierten Überexpression des Pgp entgegengewirkt werden, ohne dabei jedoch dessen physiologische Schutzfunktion zu beeinträchtigen (BAUER et al. 2008; HULS et al. 2009; PEKCEC et al. 2009; ZIBELL et al. 2009). Auf diese Art und Weise gelang die Regulation der Pgp-Expression auf Kontrollniveau sowie die Wiederherstellung der Pharmakosensitivität bei Ratten, welche sich zuvor therapieresistent gegenüber PB gezeigt hatten (SCHLICHTIGER et al. 2010; VAN VLIET et al. 2010). Die aufgeführten Studien unterstützen die *Multidrug*-Transporter-Hypothese und weisen darauf hin, dass die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression eine mögliche Ursache der Pharmakoresistenz bei Epilepsien darstellt.

Im Hinblick auf die Pgp-Expression wiesen die *Responder* in der vorliegenden Studie in der CA₃-Region des Hippocampus (Bregma -2,3) im Vergleich zu den Kontrolltieren eine höhere optische Dichte auf (Abbildung 18). Hinsichtlich der Pgp-markierten Fläche konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Tiergruppen nachgewiesen werden.

Da in den aufgeführten Studien nachgewiesen werden konnte, dass es bei *Nonrespondern* zu einer signifikanten Überexpression des Pgp kommt, sprechen diese eindeutig für die *Multidrug*-Transporter-Hypothese. In der vorliegenden Studie konnten diese Ergebnisse jedoch nur teilweise reproduziert werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es aufgrund ungenügender Anfallsaktivität der *Nonresponder* unmittelbar vor den PET-Untersuchungen zu einer nicht ausreichenden anfallsinduzierten Pgp-Überexpression kam.

Denkbar wäre ebenfalls ein *Rebound*-Effekt, welcher bei *Respondern* nach Absetzen des Antiepileptikums PB zu einem erneuten Auftreten epileptischer Anfälle führen könnte. In der Folge käme es zu einer anfallsinduzierten Induktion

von Pgp, wodurch die Pgp-Expression der *Responder* möglicherweise der der *Nonresponder* entsprechen könnte. Demzufolge läge kein Unterschied im Hinblick auf die Pgp-Expression zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* vor und könnte demnach nicht mithilfe der PET oder der immunhistochemischen Färbung dargestellt werden. Dies würde erklären, weshalb keine Unterschiede in der Anreicherung von [^{11}C]Flumazenil zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* dargestellt werden konnten. Auch die Tatsache, dass keine Korrelation zwischen der Pgp-Expression und der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelfase nachgewiesen werden konnte, lässt sich auf diese Art begründen. Vor den PET-Scans erfolgte aus diesem Grund ein Anfallsmonitoring. Dadurch kann sichergestellt werden, dass die Anfallsfrequenz der Tiere auch unmittelbar vor den PET-Untersuchungen erfasst wird. Jedoch konnte die vollständige Auswertung dieser Daten durch die niederländische Kooperationsgruppe noch nicht abgeschlossen werden.

6.2 Untersuchungen im Hinblick auf die *Target-Hypothese*

Das Antiepileptikum PB, welches zur Selektion der Tiere in *Responder* und *Nonresponder* verabreicht wurde, stellt einen direkten Modulator des GABA_A-Rezeptors dar (REMY u. BECK 2006). Durch PB wird die Erregbarkeit der Nervenzelle durch eine Potenzierung der GABAergen Inhibition reduziert (ROGAWSKI u. LOSCHER 2004; KWAN u. BRODIE 2006). Aus diesem Grund ist eine Veränderung der Untereinheiten-Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors und die daraus resultierende verminderte Sensitivität der Zielstruktur für PB eine mögliche Erklärung für das Nichtansprechen der *Nonresponder* auf die Therapie.

[^{11}C]Flumazenil stellt einen Liganden des GABA_A-Rezeptors an der Benzodiazepin-Bindungsstelle zwischen der α und der γ_2 -Untereinheit dar. Aus diesem Grund dienten die PET-Untersuchungen mithilfe des Tracers [^{11}C]Flumazenil neben der Darstellung der Pgp-Funktion zur Evaluierung von Veränderungen hinsichtlich der Untereinheiten-Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors. Im Anschluss an die PET-Untersuchungen wurde die γ_2 -Untereinheit

des GABA_A-Rezeptors immunhistochemisch quantifiziert. Zudem wurde eine Nissl-Färbung zur Evaluierung der Neurodegeneration angefertigt.

In den durchgeführten PET-Scans traten weder vor noch nach Applikation des Pgp-Modulators Tariquidar signifikante Unterschiede in der Anreicherung des Tracers [¹¹C]Flumazenil zwischen den *Respondern* und den *Nonrespondern* auf (Abbildung 9, Abbildung 11). Der radioaktiv markierte Benzodiazepin-Antagonist [¹¹C]Flumazenil bindet an die Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors, welche sich zwischen der α- und der γ₂-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors befindet (OGRIS et al. 2004; SYVÄNEN et al. 2011). Deshalb stellt [¹¹C]Flumazenil laut DEDEURWAERDERE (2009) für wissenschaftliche sowie klinische Zwecke einen vielversprechenden *Radotracer* dar, um Alterationen des GABA_A-Rezeptors, welcher das pharmakologische *Target* von PB darstellt, mithilfe der PET zu untersuchen. Die Detektion von Alterationen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten und der damit zusammenhängenden Pharmakosensitivität bzw. Pharmakoresistenz gelang in diesem tierexperimentellen Ansatz mithilfe von [¹¹C]Flumazenil als PET-*Tracer* jedoch nicht.

Im Hinblick auf die PET-Untersuchungen muss berücksichtigt werden, dass die genannten Ergebnisse lediglich SUV-basierte Daten darstellen. Bei der Anwendung des für diese Studie vorgesehenen Kinetik-Modells, dessen Auswertung durch die niederländische Kooperationsgruppe jedoch noch nicht vollständig abgeschlossen ist, werden möglicherweise abweichende Ergebnisse erzielt. Dies kann zu einer anderen Interpretation mit abweichenden Rückschlüssen führen. Die gemischte Information der beiden Bildgebungskonzepte, welche sich aus den SUV-Werten alleine ergibt, erlaubt weder die Detektion von Unterschieden der Pgp-Aktivität noch der Untereinheitenzusammensetzung des GABA_A-Rezeptors anhand des [¹¹C]Flumazenil-PET-Scans.

Um die Ergebnisse der [¹¹C]Flumazenil-Scans im Hinblick auf die Untereinheiten-Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors zu verifizieren, wurde eine immunhistochemische Färbung der γ₂-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors angefertigt.

Hinsichtlich der Expression der γ_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors konnte im Bereich der CA₁-Region des Hippocampus sowie im Hilus des *Gyrus dentatus* eine signifikant niedrigere Immunreaktivität bei der Gruppe der *Responder* im Vergleich zur Gruppe der *Nonresponder* festgestellt werden (Abbildung 20, 21). Dies entspricht Ergebnissen einer Studie von BETHMANN et al., in der ebenfalls eine Reduktion der γ_2 -Expression in der CA₁-Region bei *Respondern* nachgewiesen wurde (BETHMANN et al. 2008). In der vorliegenden Studie zeigten jedoch die *Responder* im Bereich der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* eine signifikant erhöhte γ_2 -Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 21). Dieses Ergebnis steht nicht im Einklang mit der genannten Studie, in der eine Reduktion der γ_2 -Immunreaktivität der *Nonresponder* im Vergleich zu den *Respondern* im *Gyrus dentatus* nachgewiesen wurde (BETHMANN et al. 2008).

Es ist zu beachten, dass in der vorliegenden Studie lediglich diejenigen Tiere als *Responder* eingruppiert wurden, welche eine Anfallsreduktion um 100% zeigten. Im Gegensatz dazu stellte in der Studie von BETHMANN et al. (2008) eine Anfallsreduktion um mehr als 75% das Kriterium für die Klassifizierung der *Responder* dar. Dies ist möglicherweise ein Grund dafür, dass die Ergebnisse unserer Studie nicht mit den Ergebnissen der genannten Studie übereinstimmen. Der Anstieg der γ_2 -Expression im Bereich des *Gyrus dentatus* in der vorliegenden Studie könnte das Resultat einer kompensatorischen Hochregulation darstellen. Auf diese Weise würde eine erhöhte Anzahl an Benzodiazepin-sensitiven GABA_A-Rezeptoren bereitgestellt und so der erhöhten exzitatorischen Signalübertragung an der Synapse entgegen gewirkt. Des Weiteren ist zu beachten, dass es sich bei der Messung der optischen Dichte sowie der *area* um präliminäre Daten handelt, welche anhand von stereologischen Zählungen noch exakter quantifiziert werden müssen. Die vollständige Auswertung konnte jedoch im Rahmen der vorliegenden Dissertation noch nicht abgeschlossen werden.

Bereits in früheren Studien wurde von Veränderungen hinsichtlich der Anzahl, Funktion oder Pharmakologie der GABA_A-Rezeptoren sowohl im Rahmen experimenteller Epilepsiemodelle, als auch bei humanen Epilepsiepatienten berichtet (GIBBS et al. 1997; NUSSER et al. 1998; BOUILLERET et al. 2000; ANDRE

et al. 2001).

Autoradiographische Untersuchungen gaben bereits Hinweise darauf, dass Veränderungen der GABA_A-Rezeptoren zur therapieresistenten Form der Temporallappenepilepsie beitragen können (VOLK et al. 2006). In einer früheren Studie konnte in einem chemischen SE-Modell bereits ein Anstieg Diazepam-insensitiver GABA_A-Rezeptoren nachgewiesen werden (BROOKS-KAYAL et al. 1998; COULTER 2000). Solche Veränderungen sind vermutlich auf die Expression der Gene, welche die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten kodieren, zurückzuführen (LOUP et al. 2000). Unterschiede in der Expression mehrerer GABA_A-Rezeptoruntereinheiten konnten sowohl in chemischen als auch im elektrischen SE-Modell nachgewiesen werden (BROOKS-KAYAL et al. 1998; SPERK et al. 1998; LAUREN et al. 2003). Die aufgeführten Studien unterstützen die *Target*-Hypothese als mögliche Ursache der Pharmakoresistenz bei Epilepsiepatienten.

Die γ_2 -Untereinheit wurde u.a. aufgrund der Ergebnisse, die im Rahmen der Studie von BETHMANN et al. (2008) gewonnen werden konnten, ausgewählt. Des Weiteren ist diese Untereinheit *in vivo* essentiell für die Formierung der Benzodiazepin-Bindungsstelle (SCHWEIZER et al. 2003). Ferner wurde von Mutationen der γ_2 -Untereinheit berichtet, die in generalisierten Epilepsien und febrilen Anfällen resultierten (HARKIN et al. 2002; JACOB et al. 2008). Die Arbeitsgruppe SCHWEIZER et al. (2003) konnte zeigen, dass der Funktionsverlust der γ_2 -Untereinheit der Ausprägung einer Epilepsie ursächlich zugrunde liegen kann.

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Immunreaktivität der γ_2 -Untereinheit tatsächlich auf Alterationen der Untereinheitenzusammensetzung des GABA_A-Rezeptors basieren oder ob diese lediglich auf den Untergang von Neuronen zurückzuführen sind, wurde ein *Scoring*-System zur Beurteilung der Neurodegeneration angewendet (Tabelle 5). Dadurch konnte gezeigt werden, dass *Responder* in den Bereichen der CA₁- und CA₃-Region des Hippocampus sowie im piriformen und im parietalen Cortex einen erheblichen Neuronenverlust aufwiesen (Abbildung 23). Bei *Nonrespondern* konnte ebenfalls eine deutliche Neurodegeneration in den Bereichen der CA₁- und CA₃-Region des Hippocampus nachgewiesen werden (Abbildung 23). Diese Ergebnisse

standen nicht im Einklang mit der genannten Studie von BETHMANN et al. (2008), in welcher lediglich die *Nonresponder* einen signifikanten Neuronenverlust in der CA₁- und CA₃- Region aufwiesen.

Möglicherweise ist die signifikante Reduktion der γ_2 -Expression im Bereich der CA₁-Region des Hippocampus bei *Respondern* in der vorliegenden Studie auf den deutlichen Neuronenverlust, welcher ebenfalls in dieser Region auftrat, zurückzuführen (Abbildung 20, Abbildung 23). Es ist jedoch zu beachten, dass Neurodegeneration durch visuelle Inspektion erst ab 15-20% neuronaler Zellverluste zuverlässig festgestellt werden kann (FUJIKAWA et al. 2000). Aus diesem Grund wäre es denkbar, dass die Sensitivität des angewendeten *Scoring*-Systems nicht hoch genug ist, um deutliche neurodegenerative Unterschiede zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* aufzuzeigen. Ergänzend könnte daher zur Untersuchung der Neurodegeneration eine Methode verwendet werden, welche die genaue Quantifizierung von Neuronenverlusten ermöglicht, wie es beispielsweise bei einer stereologischen Auszählungsmethode der Fall ist.

Der Abstand von vier Wochen zwischen der Selektionsphase und dem Beginn der PET-Untersuchungen könnte die Ergebnisse dieser Studie, sowohl im Hinblick auf die PET-Untersuchungen mithilfe des Tracers [¹¹C]Flumazenil, als auch hinsichtlich der γ_2 -Expression und der Neurodegeneration beeinflusst haben. Denkbar wäre beispielsweise ein *Rebound*-Effekt, welcher bei *Respondern* nach Absetzen des Antiepileptikums PB zu einem erneuten Auftreten epileptischer Anfälle führen könnte. In der Folge käme es aufgrund der vergleichbaren Anfallsaktivität bei *Respondern* und *Nonrespondern* ebenfalls zu einer vergleichbaren Zusammensetzung der Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors. Dies würde erklären, weshalb mithilfe der PET keine Unterschiede in der Anreicherung von [¹¹C]Flumazenil zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* dargestellt werden konnten. Durch eine kurz vor den PET-Untersuchungen auftretende Erhöhung der Anfallsfrequenz der *Responder* wäre eine Expressionsminderung der γ_2 -Untereinheit denkbar, wodurch eine geringere Anzahl an Benzodiazepin-Bindungsstellen und damit [¹¹C]Flumazenil-Bindungsstellen vorhanden wäre.

Die erhebliche Neurodegeneration der *Responder* entspricht in der CA₁- und CA₃-

Region des Hippocampus der der *Nonresponder* und übertrifft diese im piriformen und parietalen Cortex sogar (Abbildung 23). Auch dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass *Responder* und *Nonresponder* kurz vor den PET-Untersuchungen und den daran anschließenden histologischen Auswertungen ähnliche Anfallsfrequenzen aufgewiesen haben könnten. So wäre auch erklärbar, dass sich in der vorliegenden Studie keine Korrelation der Anfallsfrequenz der Tiere während der Vehikelpphase mit der γ_2 -Expression oder mit dem Ausmaß der Neurodegeneration herstellen ließ. Alternativ zu einer erhöhten Anfallsfrequenz der *Responder* wäre zudem eine reduzierte Anfallsaktivität der *Nonresponder* unmittelbar vor den genannten Untersuchungen denkbar. Aus diesem Grund erfolgte vor Beginn der PET-Scans ein Anfallsmonitoring der Tiere. Aufgrund der bisher unvollständigen Daten kann an dieser Stelle noch keine Aussage über die Anfallsfrequenz der Tiere unmittelbar vor den PET-Scans getroffen werden.

6.3 Untersuchungen im Hinblick auf Inflammationsprozesse

Des Weiteren wurden im Rahmen des vorliegenden Dissertationsprojektes PET-Untersuchungen mithilfe des Tracers [^{11}C]PK11195 durchgeführt (Abbildung 12). Dabei handelt es sich um einen Liganden des *translocator protein* (TSPO), welches im gesunden Gehirn nur in geringem Maße exprimiert wird (VENNETI et al. 2009). Bei Verletzungen und Entzündungsgeschehen kommt es jedoch zu einem Expressionsanstieg des TSPO, welcher mit dem Ausmaß der Mikrogliaaktivierung nach einem zerebralen Insult korreliert (SCARF et al. 2009). Deshalb bietet [^{11}C]PK11195 die Möglichkeit, durch die indirekte Quantifizierung der TSPO-Expression mithilfe der PET den Schweregrad sowie das Fortschreiten inflammatorischer Krankheitsprozesse zu untersuchen (CHING et al. 2012). In dieser Studie wurden erstmalig PET-Scans mithilfe von [^{11}C]PK11195 an pharmakosensitiven und pharmakoresistenten epileptischen Ratten durchgeführt.

In der vorliegenden Studie konnte über die Gesamtdauer des Scans eine

signifikant erhöhte Anreicherung des Tracers [^{11}C]PK11195 bei den *Nonrespondern* im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abbildung 13). Insbesondere innerhalb der Zeitintervalle 2,25 bis 3,50 min und 17,5 bis 55,0 min waren die SUV-Werte der *Nonresponder* gegenüber denen der Kontrolltiere signifikant erhöht (Abbildung 13).

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass dem Inflammationsgeschehen nicht nur in der Pathogenese von Epilepsieerkrankungen eine entscheidende Bedeutung zukommt (VEZZANI et al. 2011b), sondern ebenfalls im Hinblick auf die Pharmakoresistenz. Des Weiteren geben sie einen ersten Hinweis darauf, dass [^{11}C]PK11195 mithilfe der PET möglicherweise zur bildgebenden Darstellung der Pharmkoresistenz epileptischer Ratten geeignet ist (Abbildung 14).

Frühere Studien weisen bereits darauf hin, dass das Inflammationsgeschehen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Epilepsien spielt (CAMPBELL et al. 1993; PROBERT et al. 1997). Mithilfe von Tierversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass ein zerebrales Inflammationsgeschehen zur Hyperexzitabilität und der Entstehung epileptischer Anfälle beiträgt (VEZZANI u. GRANATA 2005; CHOI u. KOH 2008; VEZZANI et al. 2008; VEZZANI et al. 2011b). Des Weiteren konnte bei Humanpatienten mit therapierefraktären Epilepsien unterschiedlicher Genese Inflammationsgeschehen in den epileptogenen Foci nachgewiesen werden (VEZZANI et al. 2011b). Mikrogliaaktivierung sowie proinflammatorische Moleküle im Hippocampus von TLE-Patienten weisen ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen Inflammationsgeschehen und Epilepsien hin (ARONICA et al. 2007). Zudem konnte beobachtet werden, dass es nach proepileptogenen Vorfällen wie z.B. Traumen, Schlaganfällen, Fieberanfällen, viralen Infektionen oder SE zu einer raschen Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten kommt, welche mit der Ausschüttung proinflammatorischer Substanzen verbunden ist (TEMKIN 2009; RAVIZZA et al. 2011). Bei den Inflammationsprozessen, die im Zusammenhang mit Epilepsieerkrankungen auftreten, handelt es sich wahrscheinlich nicht nur um eine Begleiterscheinung, sondern vermutlich vielmehr um einen Mechanismus, der neuronaler Hyperexzitabilität ursächlich zugrunde liegt (VEZZANI u. FRIEDMAN 2011). Aus diesem Grund könnte die

Neuroinflammation als Biomarker zur Untersuchung der Entwicklung und des Schweregrades von Epilepsien dienen und somit für diagnostische, prognostische und therapeutische Zwecke von großem Nutzen sein (VEZZANI u. FRIEDMAN 2011).

Die im Rahmen dieses Dissertationsprojektes gewonnenen Erkenntnisse weisen darauf hin, dass sich der PET-Tracer [^{11}C]PK11195 möglicherweise für die Identifizierung pharmakoresistenter Epilepsien eignet. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse im Hinblick auf die bildgebende Darstellung inflammatorischer Prozesse als Mechanismus der Pharmakoresistenz mithilfe des PET-Tracers [^{11}C]PK11195 sollten weitere Studien zur Erforschung dieses Bildgebungskonzeptes durchgeführt werden. Die Praktikabilität der Anwendung und die Aussagekraft dieses Tracers sollten in zukünftigen Forschungsarbeiten überprüft werden. Des Weiteren ist zu klären, ob die mithilfe von Nagermodellen gewonnenen Erkenntnisse auf den Patienten übertragbar sind.

Abschließend wurde ein weiterer PET-Scan mithilfe des Tracers ^{18}F FDG durchgeführt (Abbildung 15). In der vorliegenden Studie konnte zu den Zeitpunkten 1,75 min, 2,75 min, 3,50 min, 4,50 min, 6,25 min und 12,50 min eine signifikant höhere Anreicherung des Tracers ^{18}F FDG bei den *Nonrespondern* im Vergleich zu den *Respondern* festgestellt werden (Abbildung 16). Für die Gesamtdauer des Scans war dies jedoch nicht der Fall (Abbildung 16). ^{18}F FDG ist ein Glukose-Analogon, welches sich zur Messung des regionalen Glukoseverbrauchs eignet. Der Tracer wird über Glukosetransporter in die Zellen aufgenommen, phosphoryliert und anschließend nicht weiter verstoffwechselt (PIMLOTT u. SUTHERLAND 2011). Durch diesen als *metabolic trapping* bezeichneten Vorgang stellt ^{18}F FDG einen indirekten Marker neuronaler Aktivität dar und ermöglicht die Auffindung des epileptischen Fokus bei Epilepsiepatienten (BARTEL u. ZIESSMANN 2010). Klinisch wird ^{18}F FDG insbesondere zur prächirurgischen Evaluierung von Epilepsiepatienten, welche nicht auf eine medikamentöse Therapie ansprechen, eingesetzt (GOFFIN et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen inflammatorischer Prozesse zu einer vermehrten Anreicherung des Tracers ^{18}F FDG kommen kann (BARTEL u. ZIESSMANN 2010). Die vorliegenden Daten geben Hinweise darauf, dass ^{18}F FDG

möglicherweise ebenfalls geeignet ist, um pharmakoresistente Tiere im elektrischen Epilepsiemodell mithilfe der PET zu identifizieren. Die Eignung dieses Tracers im Hinblick auf die Darstellung der Pharmakoresistenz bei Epilepsieerkrankungen bedarf jedoch der Überprüfung im Rahmen weiterer Studien.

6.4 Interaktionen der verschiedenen Resistenzmechanismen

Im Rahmen dieses Dissertationsprojektes wurden verschiedene Konzepte angewendet, um die Mechanismen, welche der Pharmakoresistenz von Epilepsien zugrunde liegen, zu untersuchen. Es ist von essentieller Bedeutung sich vor Augen zu führen, dass es sich hierbei um ein komplexes und multifaktorielles Geschehen handelt, woran vermutlich verschiedene Faktoren in individuell unterschiedlichem Maße beteiligt sind (KWAN u. BRODIE 2006). So wurde das Pgp-Substrat [^{11}C]Flumazenil verwendet, um die Pgp-Funktion im Hinblick auf die *Multidrug*-Transporter-Hypothese zu untersuchen. Des Weiteren stellt [^{11}C]Flumazenil einen Benzodiazepin-Antagonisten des GABA_A-Rezeptors dar und diente somit gleichzeitig zur Untersuchung der Veränderung von GABA_A-Rezeptoren im Hinblick auf die *Target*-Hypothese. Zudem wurde der TSPO-Ligand [^{11}C]PK11195 eingesetzt, um die mit Epilepsien bzw. Pharmakoresistenz in Zusammenhang stehenden Inflammationsprozesse zu evaluieren. Die Tatsache dass sich diese der Pharmakoresistenz zugrunde liegenden Mechanismen nicht klar voneinander trennen lassen, erschwert die Suche nach einem vielversprechenden PET-Tracer für die nicht-invasive Detektion der Pharmakoresistenz bei Epilepsiepatienten. Verschiedene Faktoren, die an der Entstehung, der Ausprägung der klinischen Symptomatik und der Pharmakoresistenz von Epilepsien beteiligt sind, beeinflussen sich gegenseitig. Hierzu gehören Veränderungen der Integrität der Blut-Hirn-Schranke, Alterationen molekularer Zielstrukturen von AE, neurodegenerative Prozesse und Inflammationsgeschehen im ZNS. Inflammationsprozesse im ZNS können sowohl Ursache als auch Konsequenz einer Epilepsieerkrankung sein (VEZZANI et

al. 2011b). So kommt es durch epileptische Anfallsaktivität zur Aktivierung von Mikrogliazellen, was in der Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren resultiert (VEZZANI u. GRANATA 2005). Wiederkehrende epileptische Anfälle können Inflammationsgeschehen im ZNS induzieren und chronisch aufrechterhalten (VEZZANI et al. 2011b). Im Gegenzug führen inflammatorische Prozesse zu einer Reduktion der Anfallsschwelle und somit zur Hyperexzitabilität neuronaler Netzwerke, welche wiederum in epileptischer Anfallsaktivität resultiert (HEIDA u. PITTMAN 2005; RIAZI et al. 2010).

Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass oxidativer Stress, wie er bei Entzündungsprozessen entsteht, einen Einfluss auf die Expression des *Multidrug-Transporters* Pgp haben kann (FELIX u. BARRAND 2002; ZHU u. LIU 2004). Durch epileptische Anfallsaktivität kommt es zu einer Induktion des Pgp (POTSCHKA 2010c). Epileptische Anfälle sowie Inflammationsmediatoren und -prozesse können zudem zu einer Beeinträchtigung der Integrität der BHS führen (SHLOSBERG et al. 2010). Dies kann in der Extravasation von Serumproteinen wie beispielsweise Albumin resultieren, was wiederum zu Hyperexzitabilität in umliegenden Neuronen und damit zu Anfallsaktivität führen kann (CACHEAUX et al. 2009; SHLOSBERG et al. 2010). Inflammationsprozesse und Anfallsgeschehen potenzieren sich demnach gegenseitig.

Ein weiteres zu berücksichtigendes Phänomen im Zusammenhang mit Epilepsieerkrankungen und insbesondere mit Pharmakoresistenz ist der Untergang von Nervenzellen (BETHMANN et al. 2008). So kann die anfallsinduzierte Inflammation zu Neuronenverlusten beitragen (VEZZANI u. BARAM 2007). Der Zelltod trägt seinerseits zur Aufrechterhaltung von Inflammationsprozessen bei. Zudem kommt es im Rahmen der Neuronenverluste zu einem Untergang inhibitorischer GABA_A-Rezeptoren. Eine direkte Auswirkung des Inflammationsgeschehens auf GABA_A-Rezeptoren ist ebenfalls zu beobachten. So kommt es in von Inflammationsprozessen betroffenem Nervengewebe zu einer Reduktion der GABA-medierten Inhibition (VEZZANI et al. 2011a). Zugrunde liegende Mechanismen sind hierbei die Expressionsreduktion von GABA_A-Rezeptoren an neuronalen Membranen, die Reduktion GABA_A-Rezeptor-vermittelter Cl⁻-Ströme sowie GABA_A-Rezeptor-

Trafficking und Alterationen in der Untereinheiten-Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren (STELLWAGEN et al. 2005; VIVIANI et al. 2007; FERGUSON et al. 2008; VEZZANI et al. 2011c). Die aus den beschriebenen Prozessen folgende Reduktion inhibitorischer GABAerger Neurotransmission führt zum Überwiegen exzitatorischer Signalübertragung, was in epileptischer Anfallsaktivität resultieren kann. Inflammationsprozesse, Veränderungen der GABA_A-Rezeptoren und epileptische Anfallsaktivität beeinflussen und potenzieren sich somit gegenseitig.

6.5 Schlussbetrachtungen

Es kann zusammengefasst werden, dass sich verschiedene Faktoren, welche an der Entstehung, der Ausprägung der klinischen Symptomatik und der Pharmakoresistenz von Epilepsien beteiligt sind, gegenseitig beeinflussen. Dies erschwert die Interpretation früherer experimenteller sowie klinischer Studien, ebenso wie die der im Rahmen dieser Studie erlangten Ergebnisse.

Die Entwicklung eines PET-*Tracers*, welcher sich zur Aufklärung der Ursache der Pharmakoresistenz bei Epilepsiepatienten und zur Vorhersage des Therapieerfolges eignet, erweist sich somit als schwierig.

In dieser Studie konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass sich der TSPO-Ligand [¹¹C]PK11195 als PET-*Tracer* für die Diagnostik der Pharmakoresistenz im Tiermodell eignet. Dagegen konnte gezeigt werden dass sich [¹¹C]Flumazenil weder zur Darstellung der Funktion des *Multidrug*-Transporters Pgp, noch zur Darstellung von Unterschieden in der Untereinheiten-Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors eignet. Da therapieresistente Epilepsien für Betroffene erhebliche Einschränkungen im Hinblick auf die Lebensqualität mit sich bringen, sollte die Suche nach einem geeigneten Radiopharmakon zur Darstellung der Pharmakoresistenz in zukünftigen Studien fortgeführt werden. Dies könnte zu erheblichen Verbesserungen hinsichtlich der individualisierten Diagnostik, Therapieplanung und -überwachung von Patienten führen, welche an therapieresistenten Epilepsieformen leiden.

7 Zusammenfassung

Christina Michler

Evaluierung von Radiopharmaka zur bildgebenden Darstellung der Pharmakoresistenz in einem *Status epilepticus*-Modell

Für die Behandlung von Epilepsieerkrankungen gilt derzeit eine lebenslange Medikation mit Antikonvulsiva als Therapie der Wahl. Obwohl eine Reihe von Antiepileptika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung stehen, kann bei ca. 30% der Veterinär- und Humanpatienten keine vollständige Suppression der Anfälle erreicht werden. Epilepsien solcher Patienten werden als pharmakoresistent bezeichnet. Das Problem der Pharmakoresistenz kann für Epilepsiepatienten schwerwiegende Folgen haben. Die Unfallgefahr durch das unvorhersehbare und unkontrollierte Auftreten epileptischer Anfälle, erhöhte Mortalitätsraten sowie Nebenwirkungen der Pharmakotherapie können die Lebensqualität der betroffenen Tiere und Menschen erheblich einschränken. Zudem treten beim Humanpatienten oftmals epilepsieassoziierte Komorbiditäten auf.

Bei den Mechanismen, die diesen refraktären Epilepsien zugrunde liegen, handelt es sich vermutlich um einen komplexen und multifaktoriellen Prozess. In diesem Zusammenhang werden verschiedene Hypothesen diskutiert, die als Ursache in Frage kommen. Die *Target*-Hypothese führt die Therapieresistenz auf eine Veränderung der molekularen Zielstrukturen von Antiepileptika zurück. Da bei unterschiedlichen Wirkmechanismen die Zielstrukturen voneinander abweichen, liefert sie jedoch keine Erklärung dafür, dass viele Epilepsiepatienten sich im Hinblick auf verschiedene Antiepileptika als pharmakoresistent erweisen. Jedoch können verschiedene Antiepileptika Substrat desselben Transportproteins sein. Deshalb bietet die anfallsinduzierte Überexpression von Effluxtransportern an der Blut-Hirn-Schranke, welche von der *Multidrug*-Transporter-Hypothese postuliert wird, eine plausible Erklärung für dieses Phänomen. Des Weiteren scheinen inflammatorische Prozesse des zentralen Nervensystems ebenfalls Einfluss auf die Progression und Therapierbarkeit von

Epilepsien zu nehmen.

Häufig werden invasive Methoden wie z.B. chirurgische Eingriffe oder die Vagusnervstimulation erst in Betracht gezogen, wenn mithilfe der Medikation kein Erfolg erzielt werden konnte. Für die Zukunft wäre es daher erstrebenswert, frühzeitig pharmakoresistente Patienten selektieren zu können, welche von bestimmten Therapiestrategien profitieren. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass es mithilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) möglich ist, die Mechanismen, welche der Pharmakoresistenz zugrunde liegen, genauer zu untersuchen. Es besteht die Möglichkeit, mithilfe geeigneter *Tracer* individuell für jeden Patienten feststellen zu können, ob er auf eine bestimmte Therapie ansprechen wird. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für ein optimiertes und individualisiertes Patientenmanagement dar.

Im Rahmen des vorliegenden Dissertationsprojektes wurden die Radiopharmaka [^{11}C]Flumazenil und [^{11}C]PK11195 hinsichtlich ihrer Eignung als PET-*Tracer* zur nicht-invasiven bildgebenden Diagnostik der Pharmakoresistenz untersucht. Zu diesem Zweck wurden in einem elektrischen *Post-Status epilepticus*-Modell pharmakosensitive (*Responder*) und pharmakoresistente (*Nonresponder*) Ratten selektiert. Anschließend wurden die Tiere PET-Untersuchungen unterzogen, wobei die genannten *Tracer* zum Einsatz kamen. Im Rahmen der PET-Untersuchungen, bei denen [^{11}C]Flumazenil, ein Benzodiazepin-Antagonist des GABA_A-Rezeptors, welcher ein Substrat des *Multidrug*-Transporters P-Glycoprotein (Pgp) darstellt, als *Tracer* verwendet wurde, konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Tiergruppen festgestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen somit, dass sich [^{11}C]Flumazenil nicht eignet, um Unterschiede in der Funktion bzw. Expression des *Multidrug*-Transporters Pgp oder der Zusammensetzung der Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors zu detektieren. Dieser *Tracer* stellt daher kein geeignetes Diagnostikum dar, um Pharmakoresistenzen im Rattenmodell frühzeitig mithilfe der PET erfassen zu können. Jedoch konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass es bei *Nonrespondern* im Vergleich zu Kontrolltieren zu einer signifikant erhöhten Anreicherung des *Tracers* [^{11}C]PK11195 im Bereich des Hippocampus kommt. [^{11}C]PK11195 stellt einen Liganden des *translocator*

protein (TSPO) dar, mit dessen Hilfe Inflammationsprozesse im zentralen Nervensystem näher untersucht werden können. Die erhöhte Anreicherung dieses *Tracers* bei *Nonrespondern* war über die Gesamtdauer des *Scans* zu verzeichnen. Somit gibt die vorliegende Studie Hinweise darauf, dass sich [¹¹C]PK11195 als *Tracer* für die Diagnostik der Pharmakoresistenz im Rattenmodell als nützlich erweist. Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um die Praktikabilität und Aussagekraft dieses *Radiotracers* in Hinblick auf die Identifizierung therapieresistenter Epilepsiepatienten zu überprüfen. In Zukunft muss zudem geklärt werden, ob die in diesem Nagermodell erworbenen Erkenntnisse auf den Veterinär- sowie Humanpatienten übertragbar sind.

8 Summary

Christina Michler

Evaluation of radiopharmaceuticals for imaging of pharmacoresistance in a status epilepticus model

For patients suffering from epilepsies, a lifelong therapy with antiepileptic drugs (AED) is considered to be the treatment of choice. Despite the wide range of AEDs with different mechanisms of action, complete seizure suppression can not be achieved in about 30% of veterinary and human epilepsy patients. Those cases, in which patients do not achieve seizure freedom, are termed pharmacoresistant. Resistance to treatment is a problem that can have profound consequences on epilepsy patients. The high danger of accidents due to the occurrence of unpredictable and uncontrollable epileptic seizures, elevated mortality as well as side effects of antiepileptic drugs can substantially reduce the quality of life for affected animals and humans. Additionally, disease-associated comorbidities are commonly occurring in human patients.

Mechanisms underlying these refractory epilepsies are most probably complex and multifactorial. Several hypotheses have been discussed in this light as a reason for pharmacoresistance. The target-hypothesis postulates that an alteration in cellular targets of AEDs leads to reduction of their sensitivity to treatment, thus resulting in pharmacoresistance. Since different AEDs display variant mechanisms of action on different molecular targets, it does not explain the resistance of many epilepsy patients to several AEDs. However, different AEDs can be substrates of the same transporter protein. Therefore seizure-induced overexpression of efflux transporters at the blood brain barrier, as postulated by the multidrug-transporter hypothesis renders a reasonable explanation for this occurrence. Furthermore, inflammatory processes in the central nervous system seem to affect progression and treatment options of epilepsies. In many cases, invasive methods like epilepsy surgery or vagus nerve stimulation are considered only after failure of medical treatment. Therefore it would be desirable for the future to be able to select pharmacoresistant patients

as early as possible, so that they can benefit from certain treatment strategies. Several studies indicated that by using positron-emission-tomography (PET), it is possible to assess mechanisms underlying pharmacoresistance. With the help of suitable radiotracers, there is a possibility to predict individually for every patient whether he will respond to a certain therapy. This is an important premise in order to optimize and individualize patient management.

Within the framework of this project, [^{11}C]Flumazenil and [^{11}C]PK11195 have been investigated in respect to their suitability as PET tracers for the non invasive imaging of pharmacoresistance in epilepsy. For this purpose, pharmacosensitive (*responders*) and pharmacoresistant (*nonresponders*) rats have been selected in an electric post-status epilepticus-model. Animals then underwent PET-scans with the tracers mentioned above. In the PET-scans with [^{11}C]Flumazenil, which is a benzodiazepine-antagonist of the GABA_A-receptor as well as a substrate of the multidrug-transporter p-glycoprotein (p-gp), there were no differences between the groups of animals.

The results of the present study show that [^{11}C]Flumazenil is not eligible to detect alterations in function or expression of p-gp or in subunit composition of the GABA_A-receptor. Therefore, this tracer is not an appropriate diagnostic tool to detect pharmacoresistance in rats with PET.

However, it could be demonstrated in the present study that *nonresponders* show a significantly higher uptake of the tracer [^{11}C]PK11195 in the hippocampus as compared to control animals. [^{11}C]PK11195, a ligand of the translocator protein (TSPO) can be used to further investigate inflammatory processes in the central nervous system. *Nonresponders* showed an increased tracer uptake during the total time of the [^{11}C]PK11195-Scan. Therefore, the present study indicates that [^{11}C]PK11195 can be beneficial for the diagnosis of pharmacoresistance in a rat model.

However, further studies are required to verify the practicability and validity of this radiotracer with regard to the identification of therapy resistant epilepsy patients. In the future it should also be clarified whether the findings of the present study are transferable to the veterinary and to the human patient.

9 Literaturverzeichnis

ABBOTT, N. J. (2002):

Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability.

Journal of anatomy 200, 629-638

AK, H., B. AY, T. TANRIVERDI, G. Z. SANUS, M. IS, M. SAR, B. OZ, C. OZKARA, E. OZYURT u. M. UZAN (2007):

Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in patients with focal cortical dysplasia.

Seizure 16, 493-503

ANDRE, V., C. MARESCAUX, A. NEHLIG u. J. M. FRITSCHY (2001):

Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.

Hippocampus 11, 452-468

ARONICA, E., K. BOER, E. A. VAN VLIET, S. REDEKER, J. C. BAAYEN, W. G. SPLIET, P. C. VAN RIJEN, D. TROOST, F. H. DA SILVA, W. J. WADMAN u. J. A. GORTER (2007):

Complement activation in experimental and human temporal lobe epilepsy.

Neurobiology of disease 26, 497-511

ARONICA, E., J. A. GORTER, G. H. JANSEN, C. W. VAN VELEN, P. C. VAN RIJEN, S. LEENSTRA, M. RAMKEMA, G. L. SCHEFFER, R. J. SCHEPER u. D. TROOST (2003):

Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors.

Neuroscience 118, 417-429

ARONICA, E., J. A. GORTER, M. RAMKEMA, S. REDEKER, F. OZBAS-GERCEKER, E. A. VAN VLIET, G. L. SCHEFFER, R. J. SCHEPER, P. VAN DER VALK, J. C. BAAYEN u. D. TROOST (2004):

Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy.

Epilepsia 45, 441-451

AURLIEN, D., J. P. LARSEN, L. GJERSTAD u. E. TAUBOLL (2012):

Comorbid and underlying diseases-Major determinants of excess mortality in epilepsy.

Seizure. 2012 Oct; 21(8): 537-7 [Epub 2012 Jun 26]

BANATI, R. B., G. W. GOERRES, R. MYERS, R. N. GUNN, F. E. TURKHEIMER, G. W. KREUTZBERG, D. J. BROOKS, T. JONES u. J. S. DUNCAN (1999):
[11C](R)-PK11195 positron emission tomography imaging of activated microglia in vivo in Rasmussen's encephalitis.
Neurology 53, 2199-2203

BANATI, R. B., J. NEWCOMBE, R. N. GUNN, A. CAGNIN, F. TURKHEIMER, F. HEPPNER, G. PRICE, F. WEGNER, G. GIOVANNONI, D. H. MILLER, G. D. PERKIN, T. SMITH, A. K. HEWSON, G. BYDDER, G. W. KREUTZBERG, T. JONES, M. L. CUZNER u. R. MYERS (2000):
The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity.
Brain : a journal of neurology 123 (Pt 11), 2321-2337

BARAN, H., M. GRAMER, D. HONACK u. W. LOSCHER (1995):
Systemic administration of kainate induces marked increases of endogenous kynurenic acid in various brain regions and plasma of rats.
European journal of pharmacology 286, 167-175

BARTEL, T. B. u. H. A. ZIESSMANN (2010):
Nuclear Medicine Case Review.
CV Mosby Co

BARTELS, A. L., A. T. WILLEMSSEN, J. DOORDUIN, E. F. DE VRIES, R. A. DIERCKX u. K. L. LEENDERS (2010):
[11C]-PK11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease?
Parkinsonism & related disorders 16, 57-59

BARTENSTEIN, P. u. M. KOEPP (1995):
[Benzodiazepine receptor imaging with positron emission tomography and single photon emission tomography].
Nervenarzt 66, 412-421

BATARSEH, A. u. V. PAPADOPOULOS (2010):
Regulation of translocator protein 18 kDa (TSPO) expression in health and disease states.
Molecular and cellular endocrinology 327, 1-12

BAUER, B., A. M. HARTZ, A. PEKCEC, K. TOELLNER, D. S. MILLER u. H. POTSCHKA (2008):
Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling.
Molecular pharmacology 73, 1444-1453

BAULAC, S., G. HUBERFELD, I. GOURFINKEL-AN, G. MITROPOULOU, A. BERANGER, J. F. PRUD'HOMME, M. BAULAC, A. BRICE, R. BRUZZONE u. E. LEGUERN (2001): First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nature genetics* 28, 46-48

BAUMGARTNER, C. (2001): *Handbuch der Epilepsien: Klinik, Diagnostik, Therapie und psychosoziale Aspekte*. Springer-Verlag Wien

BEAR, M. F., B. W. CONNORS u. M. A. PARADISO (2007): *Neuroscience - Exploring the brain*. Lippincott Williams & Wilkins

BECHMANN, I. (2005): Failed central nervous system regeneration: a downside of immune privilege? *Neuromolecular medicine* 7, 217-228

BEN-ARI, Y., E. TREMBLAY, D. RICHE, G. GHILINI u. R. NAQUET (1981): Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 6, 1361-1391

BENGEL, F. M., T. HIGUCHI, M. S. JAVADI u. R. LAUTAMAKI (2009): Cardiac positron emission tomography. *Journal of the American College of Cardiology* 54, 1-15

BERG, A. T., S. F. BERKOVIC, M. J. BRODIE, J. BUCHHALTER, J. H. CROSS, W. VAN EMDE BOAS, J. ENGEL, J. FRENCH, T. A. GLAUSER, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, D. NORDLI, P. PLOUIN u. I. E. SCHEFFER (2010): Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51, 676-685

BERTRAM, E. H. (2009): Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin? *Epilepsy Behav* 14 Suppl 1, 32-37

BETHMANN, K., J. M. FRITSCHY, C. BRANDT u. W. LÖSCHER (2008): Antiepileptic drug resistant rats differ from drug responsive rats in GABA A receptor subunit expression in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease* 31, 169-187

BILLINGHAM, R. E. u. T. BOSWELL (1953):
Studies on the problem of corneal homografts.
Proc R Soc Lond B Biol Sci 141, 392-406

BLUMCKE, I., H. BECK, A. A. LIE u. O. D. WIESTLER (1999):
Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy.
Epilepsy Res 36, 205-223

BORBELY, K. (2001):
[Functional imaging (PET and SPECT) in epilepsy].
Orv Hetil 142, 2405-2414

BOUILLERET, V., F. LOUP, T. KIENER, C. MARESCAUX u. J. M. FRITSCHY (2000):
Early loss of interneurons and delayed subunit-specific changes in GABA(A)-
receptor expression in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy.
Hippocampus 10, 305-324

BRAESTRUP, C. u. R. F. SQUIRES (1977):
Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity
(3H)diazepam binding.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
74, 3805-3809

BRANDT, C., K. BETHMANN, A. M. GASTENS u. W. LÖSCHER (2006):
The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-
principle in a rat model of temporal lobe epilepsy.
Neurobiology of disease 24, 202-211

BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCHKA, H. VOLK u. W. LÖSCHER (2003):
Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus
induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats.
Epilepsy Res 55, 83-103

BRANDT, C., H. A. VOLK u. W. LÖSCHER (2004):
Striking differences in individual anticonvulsant response to phenobarbital in rats
with spontaneous seizures after status epilepticus.
Epilepsia 45, 1488-1497

BRIDGERS, S. L. u. J. S. EBERSOLE (1985):
Ambulatory cassette EEG in clinical practice.
Neurology 35, 1767-1768

BRIDGERS, S. L., P. B. WADE u. J. S. EBERSOLE (1989):
Estimating the importance of epileptiform abnormalities discovered on cassette
electroencephalographic monitoring.
Archives of neurology 46, 1077-1079

- BROOKS-KAYAL, A. R., M. D. SHUMATE, H. JIN, T. Y. RIKHTER u. D. A. COULTER (1998):
Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy.
Nature medicine 4, 1166-1172
- BROWNE, T. R. u. G. L. HOLMES (2001):
Epilepsy.
N Engl J Med 344, 1145-1151
- BUTLER, T., M. ICHISE, A. F. TEICH, E. GERARD, J. OSBORNE, J. FRENCH, O. DEVINSKY, R. KUZNIECKY, F. GILLIAM, F. PERVEZ, F. PROVENZANO, S. GOLDSMITH, S. VALLABHAJOSULA, E. STERN u. D. SILBERSWEIG (2011):
Imaging Inflammation in a Patient with Epilepsy Due to Focal Cortical Dysplasia.
Journal Neuroimaging. 2011 Jan 11 [Epub ahead of print]
- CACHEAUX, L. P., S. IVENS, Y. DAVID, A. J. LAKHTER, G. BAR-KLEIN, M. SHAPIRA, U. HEINEMANN, A. FRIEDMAN u. D. KAUFER (2009):
Transcriptome profiling reveals TGF-beta signaling involvement in epileptogenesis.
The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29, 8927-8935
- CAMPBELL, I. L., C. R. ABRAHAM, E. MASLIAH, P. KEMPER, J. D. INGLIS, M. B. OLDSTONE u. L. MUCKE (1993):
Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 10061-10065
- CHANG, B. S. u. D. H. LOWENSTEIN (2003):
Epilepsy.
N Engl J Med 349, 1257-1266
- CHANG, Y., D. J. MELLOR u. T. J. ANDERSON (2006):
Idiopathic epilepsy in dogs: owners' perspectives on management with phenobarbitone and/or potassium bromide.
The Journal of small animal practice 47, 574-581
- CHING, A. S., B. KUHNAST, A. DAMONT, D. ROEDA, B. TAVITIAN u. F. DOLLE (2012):
Current paradigm of the 18-kDa translocator protein (TSPO) as a molecular target for PET imaging in neuroinflammation and neurodegenerative diseases.
Insights into imaging 3, 111-119

- CHOI, J. u. S. KOH (2008):
Role of brain inflammation in epileptogenesis.
Yonsei medical journal 49, 1-18
- CLINCKERS, R., I. SMOLDERS, A. MEURS, G. EBINGER u. Y. MICHOTTE (2005):
Quantitative in vivo microdialysis study on the influence of multidrug
transporters on the blood-brain barrier passage of oxcarbazepine: concomitant
use of hippocampal monoamines as pharmacodynamic markers for the
anticonvulsant activity.
The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 314, 725-731
- COHEN, A. S., D. D. LIN, G. L. QUIRK u. D. A. COULTER (2003):
Dentate granule cell GABA(A) receptors in epileptic hippocampus: enhanced
synaptic efficacy and altered pharmacology.
The European journal of neuroscience 17, 1607-1616
- COULTER, D. A. (2000):
Mossy fiber zinc and temporal lobe epilepsy: pathological association with
altered "epileptic" gamma-aminobutyric acid A receptors in dentate granule
cells.
Epilepsia 41 Suppl 6, S96-99
- CRESPER, A., P. COUBES, M. C. ROUSSET, C. BRANA, A. ROUGIER, G. RONDOUIN,
J. BOCKAERT, M. BALDY-MOULINIER u. M. LERNER-NATOLI (2002):
Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with
hippocampal sclerosis.
Brain research 952, 159-169
- CZECH, M., P. GRESSENS u. A. M. KAINDL (2011):
The yin and yang of microglia.
Developmental neuroscience 33, 199-209
- DEDEURWAERDERE, S., M. C. GREGOIRE, L. VIVASH, P. ROSELT, D. BINNS, C.
FOOKES, I. GREGURIC, T. PHAM, C. LOC'H, A. KATSIFIS, R. J. HICKS, T. J. O'BRIEN u.
D. E. MYERS (2009):
In-vivo imaging characteristics of two fluorinated flumazenil radiotracers in the
rat.
Eur J Nucl Med Mol Imaging 36, 958-965
- DEGEN, R. u. H. E. DEGEN (1991):
Sleep and sleep deprivation in epileptology.
Epilepsy research. Supplement 2, 235-260
- DEWEY, C. W. (2006):
Anticonvulsant therapy in dogs and cats.
The Veterinary clinics of North America. Small animal practice 36, 1107-1127

DOMBROWSKI, S. M., S. Y. DESAI, M. MARRONI, L. CUCULLO, K. GOODRICH, W. BINGAMAN, M. R. MAYBERG, L. BENGEZ u. D. JANIGRO (2001):
Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy.
Epilepsia 42, 1501-1506

DOORDUIN, J., E. F. DE VRIES, R. A. DIERCKX u. H. C. KLEIN (2008):
PET imaging of the peripheral benzodiazepine receptor: monitoring disease progression and therapy response in neurodegenerative disorders.
Curr Pharm Des 14, 3297-3315

DREIFUSS, F. E. (1994):
New antiepileptic drug development.
Epilepsia 35 Suppl 5, 6-9

DUNCAN, J. S. (1999):
Positron emission tomography receptor studies in epilepsy.
Rev Neurol (Paris) 155, 482-488

DUPONT, S. u. A. CRESPEL (2009):
[Satus epilepticus: epidemiology, definitions and classifications].
Rev Neurol (Paris) 165, 307-314

EDISON, P., H. A. ARCHER, A. GERHARD, R. HINZ, N. PAVESE, F. E. TURKHEIMER, A. HAMMERS, Y. F. TAI, N. FOX, A. KENNEDY, M. ROSSOR u. D. J. BROOKS (2008):
Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study.
Neurobiology of disease 32, 412-419

ENGEL, J., JR. (1996):
Clinical evidence for the progressive nature of epilepsy.
Epilepsy research. Supplement 12, 9-20

ENGEL, J., JR. (2001):
A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology.
Epilepsia 42, 796-803

ENGLANDER, J., T. BUSHNIK, T. T. DUONG, D. X. CIFU, R. ZAFONTE, J. WRIGHT, R. HUGHES u. W. BERGMAN (2003):
Analyzing risk factors for late posttraumatic seizures: a prospective, multicenter investigation.
Archives of physical medicine and rehabilitation 84, 365-373

- ERNST, M., D. BRAUCHART, S. BORESCH u. W. SIEGHART (2003):
Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future
developments.
Neuroscience 119, 933-943
- FAN, J., M. B. RONE u. V. PAPADOPOULOS (2009):
Translocator protein 2 is involved in cholesterol redistribution during
erythropoiesis.
The Journal of biological chemistry 284, 30484-30497
- FELIX, R. A. u. M. A. BARRAND (2002):
P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation
by transient oxidative stress.
Journal of neurochemistry 80, 64-72
- FERGUSON, A. R., R. N. CHRISTENSEN, J. C. GENSEL, B. A. MILLER, F. SUN, E. C.
BEATTIE, J. C. BRESNAHAN u. M. S. BEATTIE (2008):
Cell death after spinal cord injury is exacerbated by rapid TNF alpha-induced
trafficking of GluR2-lacking AMPARs to the plasma membrane.
The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience
28, 11391-11400
- FICKER, D. M. (2000):
Sudden unexplained death and injury in epilepsy.
Epilepsia 41 Suppl 2, S7-12
- FISHER, P. D., E. F. SPERBER u. S. L. MOSHE (1998):
Hippocampal sclerosis revisited.
Brain & development 20, 563-573
- FISHER, R. S., W. VAN EMDE BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON, P. LEE u. J.
ENGEL, JR. (2005):
Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League
Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).
Epilepsia 46, 470-472
- FRENCH, J. A., P. D. WILLIAMSON, V. M. THADANI, T. M. DARCEY, R. H.
MATTSON, S. S. SPENCER u. D. D. SPENCER (1993):
Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical
examination.
Ann Neurol 34, 774-780

FROKLAGE, F. E., S. SYVANEN, N. H. HENDRIKSE, M. C. HUISMAN, C. F. MOLTHOFF, Y. TAGAWA, J. C. REIJNEVELD, J. J. HEIMANS, A. A. LAMMERTSMA, J. ERIKSSON, E. C. DE LANGE u. R. A. VOSKUYL (2012):
[11C]Flumazenil brain uptake is influenced by the blood-brain barrier efflux transporter P-glycoprotein.
EJNMMI research 2, 12

FROMM, M. F. (2004):
Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers.
Trends in pharmacological sciences 25, 423-429

FROSCHER, W. u. K. D. NEHER (1994):
[Psychiatric changes caused by epileptic seizures].
Schweiz Arch Neurol Psychiatr 145, 4-7

FUJIKAWA, D. G., H. H. ITABASHI, A. WU u. S. S. SHINMEI (2000):
Status epilepticus-induced neuronal loss in humans without systemic complications or epilepsy.
Epilepsia 41, 981-991

GEWORSKI, L., B. O. KNOOP u. D. L. MUNZ (2005):
Bildgebende Messtechnik in der Nuklearmedizin.
Zuckschwerdt Verlag

GIATZAKIS, C. u. V. PAPADOPOULOS (2004):
Differential utilization of the promoter of peripheral-type benzodiazepine receptor by steroidogenic versus nonsteroidogenic cell lines and the role of Sp1 and Sp3 in the regulation of basal activity.
Endocrinology 145, 1113-1123

GIBBS, J. W., 3RD, M. D. SHUMATE u. D. A. COULTER (1997):
Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA(A) receptor function in dentate granule and CA1 neurons.
Journal of neurophysiology 77, 1924-1938

GODDARD, G. V., D. C. MCINTYRE u. C. K. LEECH (1969):
A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.
Experimental neurology 25, 295-330

GOFFIN, K., S. DEDEURWAERDERE, K. VAN LAERE u. W. VAN PAESSCHEN (2008):
Neuronuclear Assessment of Patients With Epilepsy.
Seminars in nuclear medicine 38, 227-239

GRAEBER, M. B. u. W. J. STREIT (2010):
Microglia: biology and pathology.
Acta neuropathologica 119, 89-105

GÜNTHER, U., J. BENSON, D. BENKE, J. M. FRITSCHY, G. REYES, F. KNOFLACH, F. CRESTANI, A. AGUZZI, M. ARIGONI, Y. LANG u. ET AL. (1995):
Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the gamma 2 subunit gene of gamma-aminobutyric acid type A receptors.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 7749-7753

HAENSE, C., K. HERHOLZ, W. J. JAGUST u. W. D. HEISS (2009):
Performance of FDG PET for detection of Alzheimer's disease in two independent multicentre samples (NEST-DD and ADNI).
Dementia and geriatric cognitive disorders 28, 259-266

HAND, K. S., V. H. BAIRD, W. VAN PAESSCHEN, M. J. KOEPP, T. REVESZ, M. THOM, W. F. HARKNESS, J. S. DUNCAN u. N. G. BOWERY (1997):
Central benzodiazepine receptor autoradiography in hippocampal sclerosis.
Br J Pharmacol 122, 358-364

HANDFORTH, A. u. R. F. ACKERMANN (1988):
Functional [14C]2-deoxyglucose mapping of progressive states of status epilepticus induced by amygdala stimulation in rat.
Brain research 460, 94-102

HANISCH, U. K. u. H. KETTENMANN (2007):
Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain.
Nature neuroscience 10, 1387-1394

HARKIN, L. A., D. N. BOWSER, L. M. DIBBENS, R. SINGH, F. PHILLIPS, R. H. WALLACE, M. C. RICHARDS, D. A. WILLIAMS, J. C. MULLEY, S. F. BERKOVIC, I. E. SCHEFFER u. S. PETROU (2002):
Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus.
American journal of human genetics 70, 530-536

HAUSER, W. A., J. F. ANNEGERS u. L. T. KURLAND (1993):
Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984.
Epilepsia 34, 453-468

HAUSER, W. A. u. E. BEGHI (2008):
First seizure definitions and worldwide incidence and mortality.
Epilepsia 49 Suppl 1, 8-12

HEIDA, J. G. u. Q. J. PITTMAN (2005):
Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat.
Epilepsia 46, 1906-1913

HEISS, W. D., L. KRACHT, M. GROND, J. RUDOLF, B. BAUER, K. WIENHARD u. G. PAWLIK (2000):

Early [(11)C]Flumazenil/H(2)O positron emission tomography predicts irreversible ischemic cortical damage in stroke patients receiving acute thrombolytic therapy.

Stroke 31, 366-369

HEISS, W. D., J. SOBESKY, U. SMEKAL, L. W. KRACHT, F. G. LEHNHARDT, A. THIEL, A. H. JACOBS u. K. LACKNER (2004):

Probability of cortical infarction predicted by flumazenil binding and diffusion-weighted imaging signal intensity: a comparative positron emission tomography/magnetic resonance imaging study in early ischemic stroke.

Stroke 35, 1892-1898

HITIRIS, N., R. MOHANRAJ, J. NORRIE, G. J. SILLS u. M. J. BRODIE (2007):

Predictors of pharmacoresistant epilepsy.

Epilepsy Res 75, 192-196

HOLOPAINEN, I. E., E. L. METSAHONKALA, H. KOKKONEN, R. K. PARKKOLA, T. E. MANNER, K. NAGREN u. E. R. KORPI (2001):

Decreased binding of [11C]flumazenil in Angelman syndrome patients with GABA(A) receptor beta3 subunit deletions.

Ann Neurol 49, 110-113

HONCHAR, M. P., J. W. OLNEY u. W. R. SHERMAN (1983):

Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats.

Science 220, 323-325

HULS, M., F. G. RUSSEL u. R. MASEREEUW (2009):

The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration.

The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 328, 3-9

ILAE (1989):

Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy.

Epilepsia 30, 389-399

ILAE (2000):

Commission on Diagnostic Strategies: recommendations for functional neuroimaging of persons with epilepsy.

Epilepsia 41, 1350-1356

- ISHIWATA, K., K. KAWAMURA, K. YANAI u. N. H. HENDRIKSE (2007):
In vivo evaluation of P-glycoprotein modulation of 8 PET radioligands used clinically.
J Nucl Med 48, 81-87
- IYER, A., E. ZUROLO, W. G. SPLIT, P. C. VAN RIJEN, J. C. BAAYEN, J. A. GORTER u. E. ARONICA (2010):
Evaluation of the innate and adaptive immunity in type I and type II focal cortical dysplasias.
Epilepsia 51, 1763-1773
- JACOB, T. C., S. J. MOSS u. R. JURD (2008):
GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition.
Nature reviews. Neuroscience 9, 331-343
- JACOBS, A. H. u. B. TAVITIAN (2012):
Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation.
J Cereb Blood Flow Metab 32, 1393-1415
- JACOBY, A. (1992):
Epilepsy and the quality of everyday life. Findings from a study of people with well-controlled epilepsy.
Soc Sci Med 34, 657-666
- JEFFERYS, J. G. (1999):
Hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy: cause or consequence?
Brain : a journal of neurology 122 (Pt 6), 1007-1008
- JONES, P. M. u. A. M. GEORGE (2004):
The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research.
Cellular and molecular life sciences : CMLS 61, 682-699
- JULIANO, R. L. u. V. LING (1976):
A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.
Biochimica et biophysica acta 455, 152-162
- JUTILA, L., A. IMMONEN, K. PARTANEN, J. PARTANEN, E. MERVAALA, A. YLINEN, I. ALAFUZOFF, L. PALJARVI, K. KARKOLA, M. VAPALAHTI u. A. PITKANEN (2002):
Neurobiology of epileptogenesis in the temporal lobe.
Advances and technical standards in neurosurgery 27, 5-22
- KAUFFMANN, G., R. SAUER u. W. WEBER (2011):
Radiologie: Bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Strahlenschutz.
Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH

KETTENMANN, H., U. K. HANISCH, M. NODA u. A. VERKHRATSKY (2011):
Physiology of microglia.
Physiological reviews 91, 461-553

KNOLL, G. F. (2012):
Radiation Detection and Measurements.
John Wiley & Sons

KRAMME, R. (2004):
Springer Wörterbuch Technische Medizin.
Springer

KRAMME, R. (2011):
Medizintechnik: Verfahren, Systeme, Informationsverarbeitung.
Springer

KUBOTA, H., H. ISHIHARA, T. LANGMANN, G. SCHMITZ, B. STIEGER, H. G. WIESER,
Y. YONEKAWA u. K. FREI (2006):
Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-
associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in
hippocampal sclerosis.
Epilepsy Res 68, 213-228

KUWERT, T. (2007):
Nuklearmedizin.
Thieme, Stuttgart

KWAN, P. (2011):
Defining drug-resistant epilepsy.
Neurology Asia 16, 35-36

KWAN, P., A. ARZIMANOGLU, A. T. BERG, M. J. BRODIE, W. ALLEN HAUSER, G.
MATHERN, S. L. MOSHE, E. PERUCCA, S. WIEBE u. J. FRENCH (2010):
Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task
Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies.
Epilepsia 51, 1069-1077

KWAN, P., S. C. SCHACHTER u. M. J. BRODIE (2011):
Drug-resistant epilepsy.
N Engl J Med 365, 919-926

KWAN, P. u. M. R. SPERLING (2009):
Refractory seizures: try additional antiepileptic drugs (after two have failed) or
go directly to early surgery evaluation?
Epilepsia 50 Suppl 8, 57-62

KWIDZINSKI, E., L. K. MUTLU, A. D. KOVAC, J. BUNSE, J. GOLDMANN, J. MAHLO, O. AKTAS, F. ZIPP, T. KAMRADT, R. NITSCH u. I. BECHMANN (2003):
Self-tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model.

Journal of neural transmission. Supplementum 29-49

KWON, C., M. LIU, H. QUAN, V. THOO, S. WIEBE u. N. JETTE (2011):
Motor vehicle accidents, suicides, and assaults in epilepsy: a population-based study.

Neurology 76, 801-806

LAMUSUO, S., A. PITKANEN, L. JUTILA, A. YLINEN, K. PARTANEN, R. KALVIAINEN, H. M. RUOTTINEN, V. OIKONEN, K. NAGREN, P. LEHIKONEN, M. VAPALAHTI, P. VAINIO u. J. O. RINNE (2000):

[11 C]Flumazenil binding in the medial temporal lobe in patients with temporal lobe epilepsy: correlation with hippocampal MR volumetry, T2 relaxometry, and neuropathology.

Neurology 54, 2252-2260

LAUREN, H. B., A. PITKANEN, J. NISSINEN, S. L. SOINI, E. R. KORPI u. I. E. HOLOPAINEN (2003):

Selective changes in gamma-aminobutyric acid type A receptor subunits in the hippocampus in spontaneously seizing rats with chronic temporal lobe epilepsy.

Neuroscience letters 349, 58-62

LAZAROWSKI, A., F. LUBIENIECKI, S. CAMARERO, H. POMATA, M. BARTULUCHI, G. SEVLEVER u. A. L. TARATUTO (2004):

Multidrug resistance proteins in tuberous sclerosis and refractory epilepsy.

Pediatric neurology 30, 102-106

LIESZ, A., E. SURI-PAYER, C. VELTKAMP, H. DOERR, C. SOMMER, S. RIVEST, T. GIESE u. R. VELTKAMP (2009):

Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke.

Nature medicine 15, 192-199

LIN, J. H. (2004):

How significant is the role of P-glycoprotein in drug absorption and brain uptake?

Drugs Today (Barc) 40, 5-22

LITMAN, T., T. E. DRULEY, W. D. STEIN u. S. E. BATES (2001):

From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance.

Cellular and molecular life sciences : CMLS 58, 931-959

LOENING, A. M. u. S. S. GAMBHIR (2003):

AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis.
Molecular imaging 2, 131-137

LÖSCHER, W. (1997):

Animal models of intractable epilepsy.
Progress in neurobiology 53, 239-258

LÖSCHER, W. (2002):

Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.
Epilepsy Res 50, 105-123

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2002a):

Role of Multidrug Transporters in Pharmacoresistance to Antiepileptic Drugs.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 301, 7-14

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2002b):

Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs.
The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 301, 7-14

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005a):

Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family.
NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental
NeuroTherapeutics 2, 86-98

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005b):

Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters.
Nature reviews. Neuroscience 6, 591-602

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005c):

Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases.
Progress in neurobiology 76, 22-76

LOUP, F., H. G. WIESER, Y. YONEKAWA, A. AGUZZI u. J. M. FRITSCHY (2000):

Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy.
The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience
20, 5401-5419

LUNA-TORTOS, C., M. FEDROWITZ u. W. LOSCHER (2008):

Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein.
Neuropharmacology 55, 1364-1375

LYNCH, M. A. (2009):

The multifaceted profile of activated microglia.

Molecular neurobiology 40, 139-156

MARCANGELO, M. J. u. F. OVSEW (2007):

Psychiatric aspects of epilepsy.

The Psychiatric clinics of North America 30, 781-802

MASUKAWA, L. M., L. J. BURDETTE, P. MCGONIGLE, H. WANG, W. O'CONNOR, M. R. SPERLING, M. J. O'CONNOR u. K. URUNO (1999):

Physiological and anatomical correlates of the human dentate gyrus: consequences or causes of epilepsy.

Adv Neurol 79, 781-794

MATHERN, G. W., T. L. BABB, J. K. PRETORIUS, M. MELENDEZ u. M. F. LEVESQUE (1995):

The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy.

Epilepsy Res 21, 133-147

MAZIERE, M., P. HANTRAYE, C. PRENANT, J. SASTRE u. D. COMAR (1984):

Synthesis of ethyl 8-fluoro-5,6-dihydro-5-[¹¹C]methyl-6-oxo-4H-imidazo [1,5-a] [1,4]benzodiazepine-3-carboxylate (RO 15.1788-11C): a specific radioligand for the in vivo study of central benzodiazepine receptors by positron emission tomography.

The International journal of applied radiation and isotopes 35, 973-976

MCINTYRE, D. C., D. NATHANSON u. N. EDSON (1982):

A new model of partial status epilepticus based on kindling.

Brain research 250, 53-63

MEALEY, K. L., S. A. BENTJEN, J. M. GAY u. G. H. CANTOR (2001):

Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene.

Pharmacogenetics 11, 727-733

MEDAWAR, P. B. (1948):

Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye.

British journal of experimental pathology 29, 58-69

MOHNIKE, W., G. HÖR u. H. SCHEIBERT (2011):

PET/CT-Atlas: Interdisziplinäre onkologische, neurologische und kardiologische PET/CT-Diagnostik.

Springer Verlag Berlin

- MONCLA, A., P. MALZAC, M. A. VOELCKEL, P. AUQUIER, L. GIRARDOT, M. G. MATTEI, N. PHILIP, J. F. MATTEI, M. LALANDE u. M. O. LIVET (1999): Phenotype-genotype correlation in 20 deletion and 20 non-deletion Angelman syndrome patients.
European journal of human genetics : EJHG 7, 131-139
- MOSSER, D. M. u. J. P. EDWARDS (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation.
Nature reviews. Immunology 8, 958-969
- NAJJAR, S., M. BERNBAUM, G. LAI u. O. DEVINSKY (2008): Immunology and epilepsy.
Reviews in neurological diseases 5, 109-116
- NASHEF, L. (1997): Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions.
Epilepsia 38, S6-8
- NGUGI, A. K., C. BOTTOMLEY, I. KLEINSCHMIDT, J. W. SANDER u. C. R. NEWTON (2010): Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach.
Epilepsia 51, 883-890
- NILSSON, L., T. TOMSON, B. Y. FARAHMAND, V. DIWAN u. P. G. PERSSON (1997): Cause-specific mortality in epilepsy: a cohort study of more than 9,000 patients once hospitalized for epilepsy.
Epilepsia 38, 1062-1068
- NISSINEN, J., T. HALONEN, E. KOIVISTO u. A. PITKANEN (2000): A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat.
Epilepsy Res 38, 177-205
- NUSSER, Z., N. HAJOS, P. SOMOGYI u. I. MODY (1998): Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses.
Nature 395, 172-177
- OGRIS, W., A. POLTL, B. HAUER, M. ERNST, A. OBERTO, P. WULFF, H. HOGER, W. WISDEN u. W. SIEGHART (2004): Affinity of various benzodiazepine site ligands in mice with a point mutation in the GABA(A) receptor gamma2 subunit.
Biochemical pharmacology 68, 1621-1629

OH, U., M. FUJITA, V. N. IKONOMIDOU, I. E. EVANGELOU, E. MATSUURA, E. HARBERTS, Y. FUJIMURA, N. D. RICHERT, J. OHAYON, V. W. PIKE, Y. ZHANG, S. S. ZOGHBI, R. B. INNIS u. S. JACOBSON (2011):

Translocator protein PET imaging for glial activation in multiple sclerosis.
Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology 6, 354-361

OLSEN, R. W. u. W. SIEGHART (2008):

International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update.
Pharmacological reviews 60, 243-260

OUCHI, Y., E. YOSHIKAWA, Y. SEKINE, M. FUTATSUBASHI, T. KANNO, T. OGUSU u. T. TORIZUKA (2005):

Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease.
Ann Neurol 57, 168-175

OWEN, D. R. u. P. M. MATTHEWS (2011):

Imaging brain microglial activation using positron emission tomography and translocator protein-specific radioligands.
International review of neurobiology 101, 19-39

PANAYIOTOPOULOS, C. (2005):

The Epilepsies: Seizures, Syndromes and Management.
Bladon Medica Publishing, Oxfordshire (UK)

PAPADOPOULOS, V., M. BARALDI, T. R. GUILARTE, T. B. KNUDSEN, J. J. LACAPERE, P. LINDEMANN, M. D. NORENBURG, D. NUTT, A. WEIZMAN, M. R. ZHANG u. M. GAVISH (2006):

Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function.
Trends in pharmacological sciences 27, 402-409

PARDO, C. A., E. P. VINING, L. GUO, R. L. SKOLASKY, B. S. CARSON u. J. M. FREEMAN (2004):

The pathology of Rasmussen syndrome: stages of cortical involvement and neuropathological studies in 45 hemispherectomies.
Epilepsia 45, 516-526

PARDRIDGE, W. M. (2003):

Molecular biology of the blood-brain barrier.
Methods in molecular medicine 89, 385-399

PAULI, E. u. H. STEFAN (2009a):

[Emotional and affective disorders in epilepsy].
Nervenarzt 80, 729-744

PAULI, E. u. H. STEFAN (2009b):

Emotional-affektive Angst- und Persönlichkeitsstörungen bei Epilepsien.
Der Nervenarzt 12, 1444-1451

PEKCEC, A., B. UNKRUER, J. SCHLICHTIGER, J. SOERENSEN, A. M. HARTZ, B. BAUER, E. A. VAN VLIET, J. A. GORTER u. H. POTSCHKA (2009):

Targeting prostaglandin E2 EP1 receptors prevents seizure-associated P-glycoprotein up-regulation.
The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 330, 939-947

PIERZCHALA, K. (2010):

[Pharmacoresistant epilepsy - epidemiology and current studies].
Neurologia i neurochirurgia polska 44, 285-290

PIMLOTT, S. L. u. A. SUTHERLAND (2011):

Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease.
Chemical Society reviews 40, 149-162

PITKANEN, A., I. KHARATISHVILI, H. KARHUNEN, K. LUKASIUK, R. IMMONEN, J. NAIRISMAGI, O. GROHN u. J. NISSINEN (2007):

Epileptogenesis in experimental models.
Epilepsia 48 Suppl 2, 13-20

PITKANEN, A., P. SCHWARTZKROIN u. S. MOSHÉ (2005):

Models of seizures and epilepsy.
Academic Press

PITKANEN, A., J. TUUNANEN, R. KALVIAINEN, K. PARTANEN u. T. SALMENPERA (1998):

Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy.
Epilepsy Res 32, 233-253

POHLMANN-EDEN, B., D. B. HOCH, J. I. COCHIUS u. K. H. CHIAPPA (1996):

Periodic lateralized epileptiform discharges--a critical review.
Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society 13, 519-530

POLITIS, M., N. PAVESE, Y. F. TAI, L. KIFERLE, S. L. MASON, D. J. BROOKS, S. J. TABRIZI, R. A. BARKER u. P. PICCINI (2011):

Microglial activation in regions related to cognitive function predicts disease onset in Huntington's disease: a multimodal imaging study.
Hum Brain Mapp 32, 258-270

POTSCHKA, H. (2009):

Avermectine: Welche Hunderassen sind empfindlich?
Praktischer Tierarzt,
Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG 90, 14-16

POTSCHKA, H. (2010a):

Targeting regulation of ABC efflux transporters in brain diseases: a novel therapeutic approach.

Pharmacology & therapeutics 125, 118-127

POTSCHKA, H. (2010b):

Transporter hypothesis of drug-resistant epilepsy: challenges for pharmacogenetic approaches.

Pharmacogenomics 11, 1427-1438

POTSCHKA, H. (2010c):

Transporterhypothese der Pharmakoresistenz von Epilepsien.

Zeitschrift für Epileptologie 152-159

POTSCHKA, H. (2012):

Animal models of drug-resistant epilepsy.

Epileptic Disorders. 2012 Sep; 14(3): 226-34

POTSCHKA, H., M. FEDROWITZ u. W. LÖSCHER (2002):

P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats.

Neuroscience letters 327, 173-176

POTSCHKA, H., H. A. VOLK u. W. LÖSCHER (2004):

Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats.

Neuroreport 15, 1657-1661

PREVETT, M. C., A. A. LAMMERTSMA, D. J. BROOKS, P. A. BARTENSTEIN, P. N.

PATSALOS, D. R. FISH u. J. S. DUNCAN (1995):

Benzodiazepine-GABAA receptors in idiopathic generalized epilepsy measured with [¹¹C]flumazenil and positron emission tomography.

Epilepsia 36, 113-121

PRICE, R. R. (1999):

The AAPM/RSNA physics tutorial for residents. MR imaging safety considerations. Radiological Society of North America.

Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc 19, 1641-1651

PROBERT, L., K. AKASSOGLU, G. KASSIOTIS, M. PASPARAKIS, L. ALEXOPOULOU

u. G. KOLLIAS (1997):

TNF-alpha transgenic and knockout models of CNS inflammation and degeneration.

Journal of neuroimmunology 72, 137-141

RACINE, R. J. (1975):

Modification of seizure activity by electrical stimulation: cortical areas.
Electroencephalogr Clin Neurophysiol 38, 1-12

RAVIZZA, T., S. BALOSSO u. A. VEZZANI (2011):

Inflammation and prevention of epileptogenesis.
Neuroscience letters 497, 223-230

RAVIZZA, T., B. GAGLIARDI, F. NOE, K. BOER, E. ARONICA u. A. VEZZANI (2008):

Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy.
Neurobiology of disease 29, 142-160

REMY, S. u. H. BECK (2006):

Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy.
Brain : a journal of neurology 129, 18-35

REMY, S., S. GABRIEL, B. W. URBAN, D. DIETRICH, T. N. LEHMANN, C. E. ELGER, U. HEINEMANN u. H. BECK (2003):

A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy.
Ann Neurol 53, 469-479

RIAZI, K., M. A. GALIC u. Q. J. PITTMAN (2010):

Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability.
Epilepsy Res 89, 34-42

RICE, S. L., C. A. RONEY, P. DAUMAR u. J. S. LEWIS (2011):

The next generation of positron emission tomography radiopharmaceuticals in oncology.
Seminars in nuclear medicine 41, 265-282

RICE, A., A. RAFIQ, S. M. SHAPIRO, E. R. JAKOI, D. A. COULTER u. R. J. DELORENZO (1996):

Long-lasting reduction of inhibitory function and gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit mRNA expression in a model of temporal lobe epilepsy.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 9665-9669

RIEUX, C., R. CARNEY, D. LUPI, O. DKHISSI-BENYAHYA, K. JANSEN, N.

CHOUNLAMOUNTRI, R. G. FOSTER u. H. M. COOPER (2002):

Analysis of immunohistochemical label of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus: comparison of different methods of quantification.
Journal of biological rhythms 17, 121-136

- ROCHA, L. u. R. ONDARZA-ROVIRA (1999):
Characterization of benzodiazepine receptor binding following kainic acid administration: an autoradiography study in rats.
Neuroscience letters 262, 211-214
- ROGAWSKI, M. A. u. M. R. JOHNSON (2008):
Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness.
Epilepsy currents / American Epilepsy Society 8, 127-130
- ROGAWSKI, M. A. u. W. LÖSCHER (2004):
The neurobiology of antiepileptic drugs.
Nature reviews. Neuroscience 5, 553-564
- ROIVAINEN, A., K. NAGREN, J. HIRVONEN, V. OIKONEN, P. VIRSU, T. TOLVANEN u. J. O. RINNE (2009):
Whole-body distribution and metabolism of [N-methyl-11C](R)-1-(2-chlorophenyl)-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide in humans; an imaging agent for in vivo assessment of peripheral benzodiazepine receptor activity with positron emission tomography.
Eur J Nucl Med Mol Imaging 36, 671-682
- RUPPRECHT, R., V. PAPADOPOULOS, G. RAMMES, T. C. BAGHAI, J. FAN, N. AKULA, G. GROYER, D. ADAMS u. M. SCHUMACHER (2010):
Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders.
Nature reviews. Drug discovery 9, 971-988
- SAKAEDA, T., T. NAKAMURA u. K. OKUMURA (2004):
Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy.
Current topics in medicinal chemistry 4, 1385-1398
- SANABRIA-BOHORQUEZ, S. M., A. G. DE VOLDER, P. ARNO, M. SIBOMANA, A. COPPENS, C. MICHEL u. C. VERAART (2001):
Decreased benzodiazepine receptor density in the cerebellum of early blind human subjects.
Brain research 888, 203-211
- SCAMBLER, G. (1993):
Epilepsy and quality of life research.
J R Soc Med 86, 449-450
- SCAMBLER, G. (2011):
Epilepsy, stigma and quality of life.
Neurology Asia 35-36

- SCARF, A. M., L. M. ITTNER u. M. KASSIOU (2009):
The translocator protein (18 kDa): central nervous system disease and drug design.
Journal of medicinal chemistry 52, 581-592
- SCARF, A. M. u. M. KASSIOU (2011):
The translocator protein.
J Nucl Med 52, 677-680
- SCHACHTER, S. C. (2002):
Vagus nerve stimulation therapy summary: five years after FDA approval.
Neurology 59, S15-20
- SCHICHA, H. u. O. SCHOBER (2007):
Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung.
Schattauer
- SCHINKEL, A. H. (1997):
The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins.
Seminars in cancer biology 8, 161-170
- SCHINKEL, A. H. (1999):
P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier.
Advanced drug delivery reviews 36, 179-194
- SCHINKEL, A. H. u. J. W. JONKER (2003):
Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview.
Advanced drug delivery reviews 55, 3-29
- SCHINKEL, A. H., C. A. MOL, E. WAGENAAR, L. VAN DEEMTER, J. J. SMIT u. P. BORST (1995):
Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice.
Eur J Cancer 31A, 1295-1298
- SCHLACHETZKI, F. u. W. M. PARDRIDGE (2003):
P-glycoprotein and caveolin-1 α in endothelium and astrocytes of primate brain.
Neuroreport 14, 2041-2046
- SCHLICHTIGER, J., A. PEKCEC, H. BARTMANN, P. WINTER, C. FUEST, J. SOERENSEN u. H. POTSCHKA (2010):
Celecoxib treatment restores pharmacosensitivity in a rat model of pharmacoresistant epilepsy.
Br J Pharmacol 160, 1062-1071

SCHMIDT, D. (1992):

Taschenatlas Epilepsien.

W. Zuckschwerdt Verlag, Germering

SCHUETZ, E. G., W. T. BECK u. J. D. SCHUETZ (1996):

Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Molecular pharmacology* 49, 311-318

SCHWARTZ, M. u. R. SHECHTER (2010):

Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease.

Nature reviews. Neurology 6, 405-410

SCHWARZER, C., K. TSUNASHIMA, C. WANZENBOCK, K. FUCHS, W. SIEGHART u. G. SPERK (1997):

GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus II: altered distribution in kainic acid-induced temporal lobe epilepsy.

Neuroscience 80, 1001-1017

SCHWEITZER, P. J., B. A. FALLON, J. J. MANN u. J. S. KUMAR (2010):

PET tracers for the peripheral benzodiazepine receptor and uses thereof.

Drug discovery today 15, 933-942

SCHWEIZER, C., S. BALSIGER, H. BLUETHMANN, I. M. MANSUY, J. M. FRITSCHY, H. MOHLER u. B. LUSCHER (2003):

The gamma 2 subunit of GABA(A) receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses.

Molecular and cellular neurosciences 24, 442-450

SEEGERS, U., H. POTSCHKA u. W. LOSCHER (2002):

Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy.

Epilepsy Res 51, 257-268

SHAH, F., S. P. HUME, V. W. PIKE, S. ASHWORTH u. J. MCDERMOTT (1994):

Synthesis of the enantiomers of [N-methyl-11C]PK 11195 and comparison of their behaviours as radioligands for PK binding sites in rats.

Nucl Med Biol 21, 573-581

SHLOSBERG, D., M. BENIFLA, D. KAUFER u. A. FRIEDMAN (2010):

Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury.

Nature reviews. Neurology 6, 393-403

SISODIYA, S. M., J. HEFFERNAN u. M. V. SQUIER (1999):

Over-expression of P-glycoprotein in malformations of cortical development.

Neuroreport 10, 3437-3441

SISODIYA, S. M., W. R. LIN, B. N. HARDING, M. V. SQUIER u. M. THOM (2002):
Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common
causes of refractory epilepsy.
Brain : a journal of neurology 125, 22-31

SPECTOR, R. (2000):
Drug transport in the mammalian central nervous system: multiple complex
systems. A critical analysis and commentary.
Pharmacology 60, 58-73

SPERK, G., C. SCHWARZER, K. TSUNASHIMA u. S. KANDLHOFFER (1998):
Expression of GABA(A) receptor subunits in the hippocampus of the rat after
kainic acid-induced seizures.
Epilepsy Res 32, 129-139

STEFAN, H., F. H. LOPES DA SILVA, W. LÖSCHER, D. SCHMIDT, E. PERUCCA, M. J.
BRODIE, P. A. BOON, W. H. THEODORE u. S. L. MOSHE (2006):
Epileptogenesis and rational therapeutic strategies.
Acta neurologica Scandinavica 113, 139-155

STEFAN, H. u. E. PAULI (2008):
[Cognition and epilepsies].
Nervenarzt 79 Suppl 2, 77-91; quiz 92

STELLWAGEN, D., E. C. BEATTIE, J. Y. SEO u. R. C. MALENKA (2005):
Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor
necrosis factor- α .
The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience
25, 3219-3228

SURGES, R. u. J. W. SANDER (2012):
Sudden unexpected death in epilepsy: mechanisms, prevalence, and prevention.
Curr Opin Neurol 25, 201-207

SYVÄNEN, S., E. C. DE LANGE, Y. TAGAWA, M. SCHENKE, C. F. MOLTHOFF, A. D.
WINDHORST, A. A. LAMMERTSMA u. R. A. VOSKUYL (2011):
Simultaneous in vivo measurements of receptor density and affinity using
[¹¹C]flumazenil and positron emission tomography: comparison of full saturation
and steady state methods.
NeuroImage 57, 928-937

TEMKIN, N. R. (2009):
Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience.
Epilepsia 50 Suppl 2, 10-13

TISHLER, D. M., K. I. WEINBERG, D. R. HINTON, N. BARBARO, G. M. ANNETT u. C. RAFFEL (1995):

MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 36, 1-6

TURRIN, N. P. u. S. RIVEST (2006):

Molecular and cellular immune mediators of neuroprotection. *Molecular neurobiology* 34, 221-242

UUSI-OUKARI, M. u. E. R. KORPI (2010):

Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacological reviews* 62, 97-135

VAN VELDEN, F. H., R. W. KLOET, B. N. VAN BERCKEL, F. L. BUIJS, G. LUURTSEMA, A. A. LAMMERTSMA u. R. BOELLAARD (2009):

HRRT versus HR+ human brain PET studies: an interscanner test-retest study. *J Nucl Med* 50, 693-702

VAN VLIET, E. A., R. VAN SCHAIK, P. M. EDELBROEK, S. REDEKER, E. ARONICA, W. J. WADMAN, N. MARCHI, A. VEZZANI u. J. A. GORTER (2006):

Inhibition of the multidrug transporter P-glycoprotein improves seizure control in phenytoin-treated chronic epileptic rats. *Epilepsia* 47, 672-680

VAN VLIET, E. A., G. ZIBELL, A. PEKCEC, J. SCHLICHTIGER, P. M. EDELBROEK, L. HOLTMAN, E. ARONICA, J. A. GORTER u. H. POTSCHKA (2010):

COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. *Neuropharmacology* 58, 404-412

VENNETI, S., B. J. LOPRESTI u. C. A. WILEY (2006):

The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Progress in neurobiology* 80, 308-322

VENNETI, S., B. J. LOPRESTI u. C. A. WILEY (2012):

Molecular imaging of microglia/macrophages in the brain. *Glia*. 2012 May 21 [Epub ahead of print]

VENNETI, S., C. A. WILEY u. J. KOFLER (2009):

Imaging microglial activation during neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 4, 227-243

VEZZANI, A., E. ARONICA, A. MAZARATI u. Q. J. PITTMAN (2011a):

Epilepsy and brain inflammation. *Experimental Neurology*. 2011 Oct 1 [Epub ahead of print]

- VEZZANI, A., S. BALOSSO u. T. RAVIZZA (2008):
The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy.
Brain, behavior, and immunity 22, 797-803
- VEZZANI, A. u. T. Z. BARAM (2007):
New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy.
Epilepsy currents / American Epilepsy Society 7, 45-50
- VEZZANI, A., J. FRENCH, T. BARTFAI u. T. Z. BARAM (2011b):
The role of inflammation in epilepsy.
Nature reviews. Neurology 7, 31-40
- VEZZANI, A. u. A. FRIEDMAN (2011):
Brain inflammation as a biomarker in epilepsy.
Biomarkers in medicine 5, 607-614
- VEZZANI, A. u. T. GRANATA (2005):
Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence.
Epilepsia 46, 1724-1743
- VEZZANI, A., M. MAROSO, S. BALOSSO, M. A. SANCHEZ u. T. BARTFAI (2011c):
IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures.
Brain, behavior, and immunity 25, 1281-1289
- VINCENT, A., S. R. IRANI u. B. LANG (2010):
The growing recognition of immunotherapy-responsive seizure disorders with autoantibodies to specific neuronal proteins.
Curr Opin Neurol 23, 144-150
- VIVIANI, B., F. GARDONI u. M. MARINOVICH (2007):
Cytokines and neuronal ion channels in health and disease.
International review of neurobiology 82, 247-263
- VOLK, H., H. POTSCHKA u. W. LOSCHER (2005):
Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables.
The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 53, 517-531
- VOLK, H. A., D. ARABADZISZ, J. M. FRITSCHY, C. BRANDT, K. BETHMANN u. W. LOSCHER (2006):
Antiepileptic drug-resistant rats differ from drug-responsive rats in hippocampal neurodegeneration and GABA(A) receptor ligand binding in a model of temporal lobe epilepsy.
Neurobiology of disease 21, 633-646

VOLK, H. A. u. W. LÖSCHER (2005):

Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures.

Brain : a journal of neurology 128, 1358-1368

WALLACE, R. H., C. MARINI, S. PETROU, L. A. HARKIN, D. N. BOWSER, R. G.

PANCHAL, D. A. WILLIAMS, G. R. SUTHERLAND, J. C. MULLEY, I. E. SCHEFFER u. S.

F. BERKOVIC (2001):

Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures.

Nature genetics 28, 49-52

WALTER, L. u. H. NEUMANN (2009):

Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration.

Seminars in immunopathology 31, 513-525

WATSON, R., Y. JIANG, I. BERMUDEZ, L. HOULIHAN, L. CLOVER, K. MCKNIGHT, J.

H. CROSS, I. K. HART, A. ROUBERTIE, J. VALMIER, Y. HART, J. PALACE, D. BEESON,

A. VINCENT u. B. LANG (2004):

Absence of antibodies to glutamate receptor type 3 (GluR3) in Rasmussen encephalitis.

Neurology 63, 43-50

WEISSL, J., V. HULSMAYER, C. BRAUER, A. TIPOLD, L. L. KOSKINEN, K. KYOSTILA, H.

LOHI, C. SAUTER-LOUIS, M. WOLF u. A. FISCHER (2012):

Disease progression and treatment response of idiopathic epilepsy in Australian Shepherd dogs.

Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine 26, 116-125

WINKELER, A., R. BOISGARD, A. MARTIN u. B. TAVITIAN (2010):

Radioisotopic imaging of neuroinflammation.

J Nucl Med 51, 1-4

WINTERMANTEL, E. u. H. SUK-WOO (2009):

Medizintechnik: Life Science Engineering: Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Zertifizierung, Business.

Springer

WOLF, H. K., M. G. CAMPOS, J. ZENTNER, A. HUFNAGEL, J. SCHRAMM, C. E.

ELGER u. O. D. WIESTLER (1993):

Surgical pathology of temporal lobe epilepsy. Experience with 216 cases.

Journal of neuropathology and experimental neurology 52, 499-506

YILMAZER-HANKE, D. M., H. K. WOLF, J. SCHRAMM, C. E. ELGER, O. D. WIESTLER u. I. BLUMCKE (2000):
Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy.
Journal of neuropathology and experimental neurology 59, 907-920

ZEECK, A., S. GROND, I. PAPASTRAVOU u. S. C. ZEECK (2005):
Chemie für Mediziner.
Elsevier Urban & Fischer

ZHU, H. J. u. G. Q. LIU (2004):
Glutamate up-regulates P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells by an NMDA receptor-mediated mechanism.
Life sciences 75, 1313-1322

ZIBELL, G., B. UNKRUEER, A. PEKCEC, A. M. HARTZ, B. BAUER, D. S. MILLER u. H. POTSCHKA (2009):
Prevention of seizure-induced up-regulation of endothelial P-glycoprotein by COX-2 inhibition.
Neuropharmacology 56, 849-855

ZIMMERMANN, R., V. I. HÜLSMEYER, C. SAUTER-LOUIS u. A. FISCHER (2009):
Status epilepticus and epileptic seizures in dogs.
Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine 23, 970-976

10 Danksagung

Frau Prof. Heidrun Potschka gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie ihre Hilfsbereitschaft und ihr Engagement bei der wissenschaftlichen Betreuung meines Dissertationsvorhabens. Ihr verdanke ich einen erheblichen Beitrag zur Förderung meiner fachlichen, beruflichen sowie persönlichen Weiterentwicklung.

Der größte Dank gilt Frau Dr. Vera Russmann für ihre jederzeit kompetente Anleitung und Hilfe in allen Lebenslagen und ihr Engagement in Sachen Tierbetreuung und Tierschutz. Danke dass du dir jederzeit für mich Zeit genommen, mir in Krankheit und Gesundheit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich immer wieder aufgebaut hast. Ohne dich wäre es nicht gegangen.

Bei Frau Dr. Christina Zellinger möchte ich mich bedanken für die unermüdliche Geduld und Unterstützung sowie kompetente Betreuung während der Erstellung dieser Dissertation.

Frau Dr. Natalie Seeger danke ich für die Einarbeitung in den Umgang mit den Tieren und dafür dass sie mir bei den Versuchen immer behilflich war.

Stina Syvänen und Marten Schenke danke ich für die Durchführung der PET-Untersuchungen, vor allem aber für die wunderbare Zeit in Amsterdam, die für mich ein unvergessliches Highlight dieses Dissertationsprojektes war.

Ein riesengroßer Dank geht an Josephine Salvamoser, Vera Russmann und Thomas Licko für ihre Freundschaft und offenen Ohren, unermessliche Geduld, Hilfsbereitschaft, Unterstützung, Motivation und die Schaffung einer unvergesslichen Arbeits- und besonders Mittagspausenatmosphäre. Danke für die lustige Zeit die ich mit euch verbringen durfte und dass ihr mich in schwierigen Situationen immer wieder aufgebaut habt!

Dr. Eva-Lotta von Rüden und Dr. Mehrnoosh Jafari danke ich für ihre unglaubliche Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei allen MitarbeiterInnen des Institutes die mir bei der Durchführung des gesamten Projektes stets zur Seite standen: Angela Vicidomini, Andrea Wehmeyer, Carmen Mayer, Regina Rentsch, Marion

Fisch, Barbara Kohler , Andreas Blaschke und Inge Sautter.

Bei Katharina Gabriel und Sabine Vican bedanke ich mich für die stets liebevolle Betreuung „meiner“ Ratten.

Der Rechnergruppe der Tierärztlichen Fakultät, besonders Herrn André Michas danke ich für die Hilfe in Sachen Computerschwierigkeiten.

Last aber mit Sicherheit nicht least danke ich Herrn Manfred Kutschka für die netten Gespräche über Fasane und sonstige „Viecher“ sowie für die Anfertigung von Kabeln, Elektroden, etc. und für Reparaturarbeiten jeglicher Art.

DANKE!

11 Anhang

11.1 Geräte

Geräte	Typ-Bezeichnung	Bezugsquelle
Stereotaktische Apparate		TSE Systems, Bad Homburg
Dentalbohrer		Fa. Karl Fischer, Pforzheim
Stimulationseinheit	Accupulser Modell A31C Stimulus Isolator A365	World Precision Instruments, Berlin
Stimulations- und EEG- Kabel	Kabelentzwirler einschließlich Anschlusskabel/Westernbuchse; Dreiaderiges, abgeschirmtes, ummanteltes Kabel; BNC-Stecker	Conrad Elektronik, München
EEG- Aufzeichnungseinheit	Ein-Kanal-Verstärker (Bio-Amps)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
	Analog-Digitalwandler (PowerLab/800s)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
	Software Chart 7 for Windows	AD-Instruments, Spechbach
Video- Aufzeichnungseinheit	Schwarz-Weiß CCD-Kameras	Conrad Elektronik GmbH, München

	Farbkamera	Conrad-Elektronik GmbH, Hannover
	Software Digi-Protect-Searcher	ABUS Group Security-Center, Affing/Mühlhausen)
HPLC mit Ultraviolett-detektor	Eurospher 100-5 C18, 250x4,6mm Smartline, 2600	Knauer, Berlin
PET-Scanner	High Resolution Research Tomograph (HRRT)	Siemens/CTI, Knoxville, TN, USA
Gamma Counter	1282 Compugamma CS, Universal Gamma Counter	LKB Wallac, Turku, Finnland
Kryostat	2800 Frigocut N	Reichert Jung, Wetzlar
Immunhistologie-Apparatur	Cover-Plates Shandon Sequenza	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Lichtmikroskop	Olympus BH2-Mikroskop mit Plan-Neofluar Linse	Zeiss, Göttingen

11.2 Lösungen

0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung)	5,7% Na_2HPO_4 1,2% NaH_2PO_4 In Aqua dest. Mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen
0,01 M Phosphatgepufferte 0,9%ige Kochsalzlösung (PBS)	0,9% NaCl 0,1 M Phosphatpuffer Mit HCL auf pH 7,6 einstellen
0,05 M Tris-gepufferte Saline (TBS)	0,9% NaCl 0,05 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan Mit HCL auf pH 7,6 einstellen
Carrier-Lösung	1% Normalserum (Esel) 1% Rinderserumalbumin (BSA) 0,3% Triton X-100 in TBS pH 7,4 – 7,6
Blocking-Lösung	11% Normalserum (Esel) 2% Rinderserumalbumin (BSA) in Carrier-Lösung pH 7,4 – 7,6

Thionin-Färbelösung	<p>100ml 1M Essigsäure</p> <p>36 ml 1 M NaOH</p> <p>mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen</p> <p>erhitzen auf 60-70°C</p> <p>darin 1,25g Thionin lösen</p> <p>1 Std auf dem Magnetrührer rühren</p> <p>Heiß filtrieren</p> <p>(Haltbarkeit der Lösung ca. 1 Monat bei Aufbewahrung bei 60°C)</p>
----------------------------	---

11.3 Substanzen

Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bepanthen® Augen-und Nasensalbe	Bayer-Vital, Leverkusen
Bupivacain (Jenapharm®)	Mibe GmbH, Brehna
Chloralhydrat	E. Merck AG, Darmstadt
3,3'Diaminobenzidin (DAB Peroxidase Substrate-Kit)	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Diazepam (Diazepam-ratiopharm®)	Ratiopharm GmbH, Ulm
EDTA-Dinatriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Einbettmedium (Tissue freezing Medium®)	Leica Nussloch GmbH, Nussloch
Entellan	E. Merck AG, Darmstadt
Ethanol 99,9%	Roth, Karlsruhe
Gentamicinsulfat 2,1%	Sigma-Aldrich, München
Heparin	Pharmacy, Leiden University Medical Centre, Leiden, Niederlande
Isofluran CP®	Cp-Pharma®, Burgdorf
Ketamin (Ketanest-S®)	Pfizer, Capelle a/d Ijssel, Niederlande
Kunststoff, kaltpolymerisierend (Paladur®)	Heraeus, Hanau
Marbofloxacin (Marbocyl®)	Vétoquinol, Ravensburg
Medetomidin (Domitor®)	Pfizer, Capelle a/d Ijssel, Niederlande

Meloxicam (Metacam®-Injektionslösung)	Boehringer-Ingelheim
Methylbutan	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natrium-Chlorid-Lösung (isoton)	B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen
Natrium-Fluorid-Lösung 0,42%	Pharmacy, Leiden University Medical Centre, Leiden, Niederlande
Phenobarbital sodium salt	Sigma-Aldrich, München
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, München
Ringer-Lactat-Lösung	Delta-Select GmbH, Dreieich
Serum	AbS Serotec, Santa Cruz
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	Biozol, Eching
Tariquidar	API Services Inc, Westford, MA, USA
Tetracainhydrochlorid (Ophtocain N)	Dr. Winzer Pharma GmbH, Berlin
Thionin (Acetate Salt)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Toluol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X100	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Xylol-Ersatz-Medium (Rotisol®)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

11.4 ProtokolleThioninfärbung (Nissl-Färbung) nativer Kryostatschnitte

3 min in 100% Alkohol

3 min in 95% Alkohol

3 min in 70% Alkohol

3 min in 50% Alkohol

3 min in Aqua dest.

30 min in Thionin-Lösung

3 min in 50% Alkohol

3 min in 70% Alkohol

3 min in 95% Alkohol

3 min in 100% Alkohol

3 min in Terpeneol/Rotisol (1:2)

3 min in Rotisol

3 min in Rotisol

Eindecken mit Entellan

Protokoll für immunhistochemische Färbungen

- Tag 1:
- Objektträger 6 Std an der Luft trocknen lassen
 - 8 min bei Raumtemperatur in frischem Aceton fixieren
 - Über Nacht trocknen lassen
- Tag 2:
- 3 x 5 min in TBS waschen
 - 30 min in 0,5% H₂O₂ inkubieren
 - 3 x 5 min in TBS waschen
 - Einspannen in Immunhistologie-Apparatur (Cover-Plates)
 - 60 min in Blocking-Lösung inkubieren
 - Über Nacht mit primärem Antikörper in Carrier-Lösung inkubieren (4°C)
- Tag 3:
- 4 x 5 min in TBS waschen
 - 90 min mit sekundärem Antikörper in Carrier-Lösung inkubieren
 - 4 x 5 min in TBS waschen
 - 60 min mit Streptavidin-HRP in TBS inkubieren
 - Objektträger aus der Cover-Plates-Apparatur entnehmen und in Küvette weiterfärben
 - 4 x 5 min in TBS waschen
 - 10 min in DAB (DAB Peroxidase-Substrate-Kit, Vector Laboratories) inkubieren

2 x 5 min in TBS waschen

1 x 5 min in Aqua dest. waschen

An der Luft trocknen, anschließend mit Entellan eindecken